

Relations entre la fixation tissulaire* et la durée d'action des trypanocides

par F. BÉNAZET

Cette note, consacrée à l'étude de la distribution de quelques trypanocides préventifs chez le rat, montre que ces produits ont tous la propriété de se fixer dans certains organes et d'y persister longtemps.

Cette fixation tissulaire paraît le plus important des facteurs qui conditionnent la durée d'action des médicaments trypanocides.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons comparé à la pentamidine (Lomidine, formule I), trois produits qui ont été récemment découverts et étudiés dans les Laboratoires de Recherches de MAY & BAKER Ltd (Dagenham, Essex) :

1° le métamidium (1-10) sous forme de chlorhydrate de chlorure (formule II ; M & B 4404).

2° le métamidium, sous forme de suraminat (Moranyl) (M & B 4.427).

3° un nouveau dérivé analogue de la phénanthridine (2), sous forme de chlorhydrate de chlorure (formule III ; M & B 4.596).

Les produits ont été dosés chez le rat à des intervalles échelonnés de trente minutes à huit mois après leur administration par voie sous-cutanée, à l'aide d'une méthode biologique consistant à déterminer l'activité curative du sang ou de broyats d'organes des rats sur une infection expérimentale à *Trypanosoma brucei* ou à *Trypanosoma congolense* de la souris.

* Texte d'une communication présentée au 1^{er} Congrès international de Pharmacologie-Stockholm 22-25.8.61).

Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop. 1962, 15, n° 1.

Reçu pour publication en octobre 1961.

ADMINISTRATION DES PRODUITS

Les produits ont été administrés au rat en un traitement unique, les doses étant contenues dans le volume de 10 ml/kg.

La pentamidine a été donnée en solution aqueuse sous forme d'iséthionate à la dose de 50 mg/kg s. c.,

le chlorhydrate de chlorure de métamidium en solution aqueuse aux doses de 20-50-500 mg/kg s. c.,

le suraminat de métamidium en suspension aqueuse aux doses de 20 et 200 mg/kg s. c.,

le M & B 4596 en solution aqueuse à la dose de 20 mg/kg s. c.

Les doses sont exprimées, selon le cas, en base ou en hydroxyde d'ammonium quaternaire.

DOSAGES DANS LE SANG ET LES ORGANES DE RATS

Les rats sont sacrifiés par groupes à intervalles échelonnés après l'administration des produits ; leur sang est recueilli sur héparine, le foie et la rate prélevés et broyés en présence de soluté physiologique (2 ml de soluté physiologique pour 1 g d'organe).

Des groupes de cinq souris inoculées 48 heures avant par voie intrapéritonéale à l'aide d'une suspension de *T. congolense* (pour les dosages des dérivés de la phénanthridine) ou par voie sous-cutanée à l'aide d'une suspension de *T. brucei* (pour les dosages de pentamidine), reçoivent en injection sous-cutanée unique, soit 1 ml de sang des rats traités (sang de 5 à 10 rats) ou de ses dilutions en sang de rat normal, soit 1 ml de broyats de foie ou de rate (organes de

5 à 10 rats broyés ensemble) ou de leurs dilutions en soluté physiologique. Parallèlement, des souris sont traitées par voie sous-cutanée à des doses échelonnées du produit à doser.

L'évolution de l'infection est suivie par la recherche tous les deux jours des trypanosomes dans le sang des souris pendant trois semaines. On détermine les dilutions auxquelles le sang et les broyats d'organes des rats traités avec chaque produit empêchent l'apparition des parasites chez la moitié des souris et la DC₅₀ du produit correspondant ; de leur comparaison l'on déduit la quantité de ce produit contenue dans 1 ml de sang ou 1 g d'organe.

La sensibilité de cette méthode de dosage est bonne dans le cas des produits très actifs comme les phénanthridines, mais beaucoup moins dans le cas de la pentamidine. Les concentrations qu'elle permet de déceler sont de l'ordre de 50 µg/ml (ou 50 µg/g) de pentamidine, de 0,05 à 0,75 µg/ml de M. & B. 4404, de 0,25 à 1 µg/ml de M. & B. 4427, de 5 µg/ml de M. & B. 4.596.

RÉSULTATS

Il n'a pas été décelé de produit dans le sang des rats aux temps où nous l'avons recherché, soit 30 minutes, 1-4-24-48 heures après l'administration de 200 mg/kg s. c. de suraminat de métamidium ou de 50 mg/kg s. c. de chlorhydrate de chlorure de métamidium. Après administration d'une dose dix fois plus forte de ce dernier produit (500 mg/kg s. c.), nous en avons décelé seulement de faibles concentrations aux emps 4 h et 24 h (respectivement 0,4 et 0,2 µg/ml), mais non au temps 8 jours.

Les résultats des dosages dans le foie et la rate sont rassemblés dans le tableau ci-annexé.

Ce tableau montre que l'on décèle du produit actif dans le foie des rats pendant 4 à 8 jours après l'administration de 50 mg/kg s. c. de pentamidine, dans le foie et la rate pendant plus de 3 mois après l'injection de 50 mg/kg s. c. de chlorhydrate de chlorure de métamidium.

Après administration de 20 mg/kg s. c., du produit actif est décelable dans le foie pendant au moins 6 mois dans le cas de M. & B. 4.596, pendant plus d'un mois, mais moins de trois mois, dans le cas du suraminat de métamidium pendant 2 mois lorsqu'il s'agit de chlorhydrate de chlorure de métamidium.

DISCUSSION

Ces essais montrent que les produits étudiés sont décelables dans certains organes (foie, rate) dès les premières heures qui suivent leur administration par voie sous-cutanée et pendant un temps qui varie selon le produit et la dose administrés, de quelques jours à plusieurs mois.

Au contraire ces produits ne sont pas décelables dans le sang ou, s'ils le sont, c'est seulement pendant une période très brève et à la condition que la dose administrée soit importante.

Ce comportement particulier des trypanocides préventifs a été déjà observé par divers auteurs pour la pentamidine et d'autres produits que ceux qui font l'objet de cette étude, à l'aide de méthodes de dosage différentes de la nôtre.

Ainsi FULTON (5), après administration de stilbamidine marquée au C¹⁴ par voie intraveineuse ou intrapéritonéale au rat, n'a décelé du produit que pendant les deux premières heures dans le sang, mais en a trouvé pendant plusieurs mois dans les organes (foie et reins en particulier).

LAUNOY, GUILLOT et JONCHÈRE (7), utilisant deux pentamidines marquées au C¹⁴ en deux points différents de la molécule, ont montré que ce produit est décelable pendant plus d'un mois dans le foie et pendant plus de sept mois dans les reins, après son administration au rat à la dose de 5 mg/kg i. m., alors qu'il n'est trouvé à aucun moment dans le sang. Après administration d'une dose dix fois plus forte (50 mg/kg/i. m.), il n'est décelé dans le sang que d'une façon très transitoire.

GOODWIN et coll. (6) ont étudié la répartition d'un dérivé de la phénanthridine (éthanesulfonate de carbidium) chez le lapin, la souris et le rat à l'aide d'une méthode de dosage colorimétrique. Ils n'ont pas pu le mettre en évidence dans le sang après administration au lapin par voies intrapéritonéale ou sous-cutanée. Chez la souris, le produit est décelable dans le sang immédiatement après une administration par voie intraveineuse, mais ne l'est plus trente minutes plus tard ; chez le rat, il est décelé dans le foie et les reins, mais non dans l'urine.

De même, A. E. TAYLOR (9) n'a pu mettre en évidence de prothidium dans le sang ni dans l'urine de rat après injection de 7,5 mg/kg i. p. de produit, alors qu'elle en a trouvé pendant

sept jours dans le foie et les reins; l'autofluorescence du prothidium a permis de voir que, dans le foie, le produit se trouve dans les cellules parenchymateuses et aussi dans les cellules de KUPFFER. A. E. TAYLOR estime que l'activité prophylactique du prothidium est due, au moins en partie, à sa fixation par le foie.

Les observations que nous avons rappelées concernant divers trypanocides préventifs sont concordantes et concourent à montrer la rétention de ces produits dans certains organes (le foie et les reins en particulier) et leur disparition très rapide du sang circulant. Nos essais les confirment et étendent leur validité à d'autres médicaments préventifs des trypanosomoses. Ils montrent, en outre, que le produit fixé se trouve dans les organes sous une forme active; c'est précisément l'intérêt de notre méthode biologique de dosage de déceler les produits sous leur forme active alors que les méthodes physicochimiques de dosage font courir le risque de doser un produit inactif ou au contraire de laisser passer inaperçu un métabolite actif. Par contre, elle ne permet pas de reconnaître si l'activité d'un trypanocide est liée au produit lui-même ou à un métabolite de ce produit.

Ce comportement des trypanocides préventifs s'oppose aux trypanocides curatifs (arsénicaux, Bérénil) qui eux sont décelables dans le sang, ne paraissent pas retenus dans les organes mais sont au contraire rapidement éliminés par l'urine.

Il est donc probable que la fixation tissulaire et l'action trypanocide préventive sont liées. Il semble même y avoir une relation étroite entre la durée de protection que confèrent les trypanocides et leur persistance dans les organes. Ainsi, une dose de 20 mg/kg s. c. de M. & B. 4.596 qui protège le rat pendant plus de dix mois vis-à-vis d'une infection à *T. congolense* détermine des concentrations hépatiques décelables par notre méthode de dosage pendant environ six mois, le M. & B. 4.404, à la même dose protège sept mois il est décelable dans le foie pendant deux mois; à la dose de 50 mg/kg s. c., la pentamidine protège un mois vis-à-vis d'une infection à *T. brucei* et peut être décelée pendant quelques jours seulement.

Cependant la fixation tissulaire des trypanocides préventifs n'est pas le seul facteur qui conditionne leur durée d'action. Celle-ci dépend cer-

tainement aussi de la vitesse de diffusion des produits à partir du point d'injection. Une expérimentation de SAUVEL (8) concernant le suramate de métamidium paraît démontrer qu'un ralentissement de la vitesse de diffusion entraîne un allongement de la durée d'action de ce produit. En effet, cet auteur a observé que le suramate de métamidium administré à des bouvillons par voie sous-cutanée les protège pendant plus longtemps que la même dose de ce produit administrée par voie intraveineuse. Or, l'administration sous-cutanée de suramate de métamidium provoque la formation au point d'injection d'un dépôt de produit qui ne se résorbe que très lentement.

C'est probablement aussi parce qu'elles déterminent un dépôt au point d'injection que les combinaisons insolubles pentamidine-suramine [COSAR et coll. (3)] et éthidium-suramine [DESOWITZ (4)] ont, administrées en suspension par voie sous-cutanée, une action préventive plus prolongée que chacun de leurs constituants administré par la même voie à dose équivalente en solution aqueuse. De plus, le ralentissement de la vitesse de diffusion des produits que provoque leur injection sous forme de complexes insolubles a pour conséquence de permettre l'administration de doses qui seraient toxiques pour l'animal si le produit était injecté sous une forme soluble et d'augmenter ainsi les doses de produit utilisables pour la prévention des trypanosomoses.

Si la formation d'un dépôt au point d'injection a pour effet de prolonger la durée d'action de certains trypanocides, ce dépôt n'est cependant pas nécessaire pour qu'un produit manifeste une activité de longue durée. En effet, comme nous l'avons rappelé ci-dessus, la pentamidine, le métamidium, le produit M. & B. 4.596 administrés par voie sous-cutanée sous forme de sels solubles manifestent une action préventive prolongée.

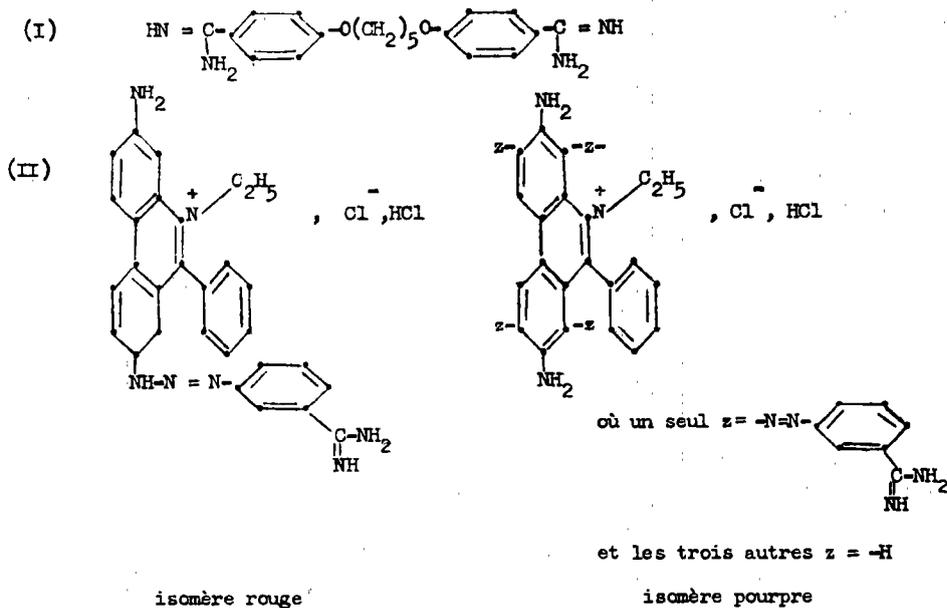
Le dépôt peut même avoir une influence défavorable s'il empêche la diffusion du produit en provoquant une réaction locale qui aboutit rapidement à son enkystement et empêche complètement sa diffusion dans l'organisme.

Si la formation d'un dépôt sous-cutané n'est pas nécessaire, elle ne paraît pas non plus suffisante à conférer à un trypanocide une longue durée d'action. Ainsi l'administration de Bérénil

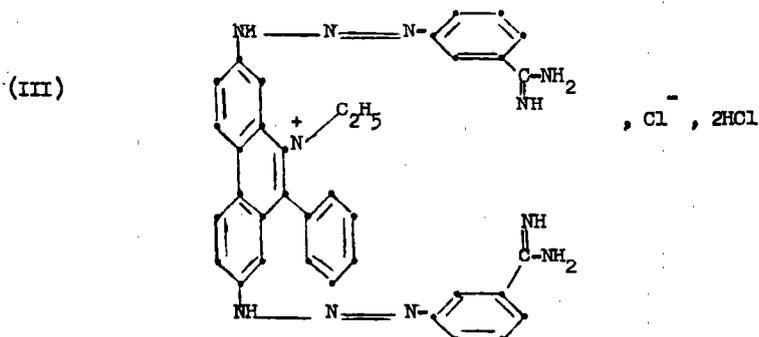
TABLEAU I - Concentrations des produits en $\mu\text{g/g}$ d'organe

Temps des prélèvements	Pentamidine, iséthionate	Métamidium					M.B. 4596
		chlorhydrate de chlorure (M.B. 4404)		suraminat (M.B. 4427)			
	50 mg/kg s/c (a)	50 mg/kg s/c (b)	20 mg/kg s/c (b)	20 mg/kg s/c (b)	20 mg/kg s/c (b)	20 mg/kg s/c (b)	
	foie	foie	rate	foie	foie	rate	foie
4 heures	100				40	40	
1 jour	115				3		
2 jours					4		
4 jours	55	45	45		3,5	0,5	
8 jours	55				0,25	1,5	
15 jours		120	100		1,5	0,45	
1 mois		1,5	15				66
2 mois				0,85			28
3 mois		1,5	15	0,4	1	1	73
4 mois				0,1			7
5 mois				0,8			8
6 mois							6
8 mois							

(a) doses exprimées en base. (b) doses exprimées en hydroxyde d'ammonium quaternaire.



Le métamidium (II) est un mélange de ces deux isomères. (approximativement 45 % d'isomère rouge + 55 % d'isomère pourpre).



par voie sous-cutanée aux bovins sous forme d'un complexe insoluble Bérénil-suramine, bien qu'il provoque un dépôt au point d'injection, ne prolonge pas notablement la durée de l'action préventive du Bérénil vis-à-vis de la trypanosomose à *T. congolense*.

En somme, il semble que l'affinité tissulaire des trypanocides soit une propriété nécessaire pour qu'ils manifestent une activité préventive de longue durée ; leur éventuelle aptitude à former un dépôt au point d'injection apparaît comme une propriété complémentaire utile, mais non indispensable.

Si l'importance de la fixation tissulaire des trypanocides comme facteur conditionnant leur durée d'action ne fait pas de doute, il reste cependant de nombreux points à éclaircir, en particulier les raisons pour lesquelles l'action préventive persiste chez l'animal alors que les produits ne sont plus décelables dans les organes, le lieu du stockage des produits (parenchymes, tissu conjonctif ou cellules réticulo-endothéliales des organes), le mécanisme par lequel le produit fixé sur les tissus agit sur les trypanosomes, la forme (produit non modifié ou métabolite) sous laquelle il agit.

La persistance de la protection des animaux après la disparition des produits du foie et de la rate est probablement explicable par une insuf-

fisance de sensibilité de notre méthode de dosage ou par la rétention des produits dans des organes où nous ne les avons pas recherchés (reins en particulier). Quant aux trois dernières questions posées, nous ne pouvons pour l'instant y répondre valablement.

CONCLUSION

L'étude de la répartition de quelques trypanocides préventifs (phénanthridines, pentamidine) chez le rat à l'aide d'une méthode de dosage biologique montre que ces produits se trouvent en quantité appréciable dans les organes pendant plusieurs semaines ou mois après leur administration par voie sous-cutanée. Au contraire, ils ne sont pas décelables dans le sang ou ne le sont que pendant un temps très court.

Cette fixation tissulaire paraît le plus important des facteurs qui conditionnent la durée d'action des trypanocides ; celle-ci dépend aussi de la vitesse de diffusion des produits, en particulier de leur aptitude éventuelle à former un dépôt au point d'injection, mais l'importance de ces facteurs semble secondaire.

*Laboratoire de Recherches pharmaceutiques
de la Société des Usines chimiques
Rhône-Poulenc
Vitry-sur-Seine*

SUMMARY

Relations between Tissue Fixation and duration of activity of Trypanocides

Research on the distribution of the prophylactic trypanocides (phénanthridin, pentamidin) in the rat by biological dosage, shows that these drugs are found in significant quantities in the organs for several weeks or months after sub-cutaneous administration. On the contrary, they cannot be detected in the blood except for a very short period after administration.

This tissue fixation appears to play a most important part in the duration of the trypanocidal activity. This is also related to the speed of diffusion of the drugs and in particular, their possible property of forming a deposit at the site of injection. However, the latter fact seems less important.

RESUMEN

Relacion entre la fijacion tisular y la duracion de accion de algunos tripanocidas

El estudio de la distribucion de algunos tripanocidas preventivos en la rata (fenantridinas y pentamidina), empleando un metodo de dosificacion biologico, ha demostrado que estos productos permanecen en cantidad apreciable en los organos durante algunas semanas despues de su administracion por via subeutanea. Al contrariano son revelados en la sangre o lo son durante un periodo muy corto.

Esta fijación tisular parece explicar el más importante de los factores que condicionan la duración de los tripanocidas ; la cual depende también de la velocidad de difusión de estos productos, en particular de su aptitud para formar depósitos eventuales en el punto de inyección aunque la importancia de estos factores parece secundaria.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERG (S. S.). — Structure of isometamidium (M. & B 4180 A), 7- m-amidinophenyldiazo-amino-2-amino-10-ethyl-9-phenylphenanthridinium chloride hydrochloride, the red isomer present in metamidium. *Nature*, 1960, **188** : 1106-7.
2. BERG (S. S.), HILL (J.) and WRAGG (W. R.). — A new prophylactic trypanocidal drug : 2 : 7-di- (m-amidinophenyldiazoamino)-10-ethyl - 9 - phenylphenanthridinium chloride dihydrochloride (M & B 4596). *Nature* (Sous presse).
3. COSAR (Ch.), DUCROT (R.), GAILLIOT (P.) et BAGET (J.). — Etude du sel suramine-pentamidine (4.891 R. P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148** : 78-81.
4. DESOWITZ (R. S.). — Suramin complexes. II-Prophylactic activity against *Trypanosoma vivax* in cattle. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1957, **51** : 457-63.
5. FULTON (J. D.) and MATHEW (K. K.). — Tracer studies of the distribution and trypanocidal action of stilbamidine in rat. *Brit. J. Pharmacol.*, 1959, **14** : 137-41.
6. GOODWIN (L. G.), GOSS (M. D.) and LOCK (J. A.). — The chemotherapeutic action of phenanthridine compounds. III : The pharmacological properties of 3-amino-9p-carbethoxyaminophenyl-10methylphenanthridinium salts. *Brit. J. Pharmacol.*, 1950, **5** : 287-305.
7. LAUNOY (L.), CUILLOT (M.) et JONCHÈRE (H.). — Etude du stockage et de l'élimination de la pentamidine chez la souris et le rat blanc. *Ann. Pharm. fr.*, 1960, **18** : 273-84 et 424-39.
8. SAUVEL (R.). — Communication personnelle.
9. TAYLOR (A. E. R.). — The absorption, distribution and excretion of prothidium in rats, rabbits and cattle. *Brit. J. Pharmacol.*, 1960, **15** : 235-42.
10. WRAGG (W. R.), WASHBOURN (K.), BROWN (K. N.) and HILL (J.). — Metamidium : a new trypanocidal drug. *Nature* 1958, **182** : 1005-6.