

Étude expérimentale de *Dermatophilus congolensis* et de sa sensibilité au miconazole

par T. K. TCHALIM (*)

RÉSUMÉ

L'action bactériostatique et bactéricide du miconazole sur *Dermatophilus congolensis* est démontrée *in vitro*. L'inoculation par la voie sous-cutanée chez la souris blanche semble un bon modèle expérimental.

L'activité thérapeutique du miconazole n'a pas pu être mise en évidence.

INTRODUCTION

La dermatophilose est une maladie cosmopolite affectant l'épiderme des mammifères sauvages et domestiques. Quelques cas humains ont été également signalés. C'est une pseudomycose (33) causée par *Dermatophilus congolensis*, parasite extrêmement polymorphe désigné autrefois sous plusieurs autres noms tels *Tetragenus congolensis* Van Saceghem, 1934 ; *Actinomyces dermatonomus* Bull, 1929 ; *Actinomyces congolensis* Hudson, 1937 ; *Polyseptia pedis* Thompson, 1934. En réalité, selon AUSTWICK (1), GORDON (11) et ROBERTS (24), il ne s'agit que d'une seule espèce : *Dermatophilus congolensis* observée à des stades différents ou dans des conditions particulières qui ne permettent pas l'apparition de toutes ses formes.

Dans la classification des Actinomycétales de WAKSMAN, modifiée par VANBREUSEGHEM (32), *Dermatophilus congolensis* appartient à la famille des Polyseptaceae (31).

Outre de nombreux aspects épizootiques, le problème du traitement de la dermatophilose

est encore mal défini. Son prix de revient élevé à l'échelle d'un grand troupeau et les irrégularités de ses résultats, le rend d'application difficile. Citons cependant, parmi les travaux consacrés à ce sujet, quelques produits ayant révélé leur efficacité dans les conditions naturelles ou expérimentales. Ce sont les antiseptiques (38, 8, 40, 14, 9, 13), les antibiotiques (29, 25, 2, 35). Certains auteurs (19, 17, 20) constatent l'efficacité de certains acaricides et les préconisent comme mesures prophylactiques contre la dermatophilose. D'autre part, des essais de vaccination ont été faits par PERREAU et CHAMBRON (18) et VIGIER et BALIS (39), et plus récemment par CHAMOISEAU et LEFEVRE (6) dans la dermatophilose expérimentale du lapin et par CHAMOISEAU, PROVOST et TOUADE (7) contre la dermatophilose naturelle du zébu.

Le présent travail a pour but de tester *in vitro* et *in vivo* la sensibilité de *Dermatophilus congolensis* vis-à-vis d'un dérivé imidazolé : le miconazole (R14 889) (*) qui s'est montré actif sur certaines actinomycétales, mais qui s'est révélé surtout comme un bon antifongique (GODEFROIE *et al.*, 1969 ; BRUGMANS *et al.* (4) ; BOTTER (3) ; GODTS *et al.* (10) ; VAN CUTSEM et THIENPONT (36).

(*) Travail effectué au laboratoire de Mycologie (Pr. Dr. R. Vanbreuseghem) de l'Institut de Médecine Tropicale « Prince Léopold » Anvers. Adresse actuelle : Université du Bénin, Faculté des Sciences, B. P. 1515, Lomé, Togo.

(*) Ce produit nous a été aimablement fourni par la firme Janssen-Pharmaceutica.

A. ESSAIS *IN VITRO*

1. Activité bactériostatique

Matériel et méthodes

Les différentes souches de *Dermatophilus congolensis* utilisées sont les suivantes :

RV 17347 isolée du bœuf	Zaïre
RV 17745 isolée de l'âne	Somalie
RV 22002 isolée du veau	Nigéria
RV 27995 isolée de la vache	Zaïre
RV 28000 isolée de la vache	Zaïre
RV 28166 isolée de la génisse	Nigéria
RV 28711 isolée du bœuf	Zaïre

Ces souches sont entretenues sur BHI Agar (Brain Heart Infusion) à 37 °C et repiquées tous les 4 à 7 jours.

Le miconazole est mis en suspension dans l'éthanol à 50 p. 100 à raison de 20 mg/ml et ensuite dilué de moitié dans l'eau distillée stérile. Des dilutions décimales successives sont réalisées avec de l'eau distillée (36).

A chaque tube (16 × 160 mm) contenant 4,5 ml de BHI liquide, 0,5 ml de diverses dilutions de miconazole est ajouté de façon à obtenir 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 µg/ml.

Un tube témoin (T) est constitué en ajoutant 0,5 ml d'eau distillée à 4,5 ml de BHI liquide. A un second tube témoin (TE), on a ajouté 0,5 ml d'éthanol à 50 p. 100.

Pour chaque souche testée, deux séries de dilutions sont réalisées. Chaque tube estensemencé avec 3 gouttes d'une suspension de cultures âgées de 4 à 7 jours, obtenues sur BHI liquide à 37 °C.

Une première lecture est faite après 7 jours, le résultat final étant enregistré après 14 jours d'incubation à 37 °C.

Les résultats sont appréciés en notant l'importance de la croissance du micro-organisme par rapport à celle observée dans le tube témoin : 4/4 qui correspond à la croissance maximale. Lorsqu'on a une absence complète de croissance, on note 0/4. Pour les croissances intermédiaires on note 1/4, 2/4, 3/4.

Résultats et discussion

Les résultats présentés dans le tableau I montrent que le miconazole est actif sur *D. congolensis* puisque pour deux souches, la CIM (concentration inhibitrice minimale) est de 0,1 µg/ml ; pour trois souches la CIM est de 1 µg/ml ; pour deux enfin elle est de 10 µg/ml.

Les résultats sont les mêmes après 7 et 14 jours d'incubation (tabl. I).

TABL. N°I-Activité bactériostatique du Miconazole sur différentes souches de *Dermatophilus congolensis* : résultats après 14 jours d'incubation.

Souches	Doses de Miconazole en µg/ml							T	TE
	1000	100	10	1	0,1	0,01	0,001		
RV 17347	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	4/4	4/4	4/4
RV 17745	0/4	0/4	0/4	2/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4
RV 22002	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4
RV 27995	0/4	0/4	0/4	2/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4
RV 28000	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4
RV 28166	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4
RV 28711	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4

T - témoin eau ; TE = témoin éthanol.

Il semble que la sensibilité de *D. congolensis* varie selon les caractéristiques morphologiques des souches, les plus sensibles étant celles qui sont très riches en zoospores (RV 28000 et RV 17347). Par contre, les souches très pauvres en zoospores (RV 27995 et surtout RV 17745) sont les moins sensibles. Cela démontre que les résultats obtenus avec une seule souche ne peuvent être extrapolés aux autres et que l'irrégularité du traitement observée dans les conditions naturelles pourrait être due à ces différences intraspécifiques.

Signalons que, comme d'autres (15), nous avons constaté qu'en présence de sérum — 10 p. 100 de sérum de mouton inactivé à 56 °C pendant 1 h — la CIM des souches augmente (voir tabl. II). Ceci s'explique par un haut degré

TABL. N°II-Influence du sérum du mouton sur l'activité bactériostatique du Miconazole

Souches	Concentration du Miconazole en µg/ml :									
	avec sérum (+) ou sans sérum (-)									
	1000	100	10	1	0,1	0,01	0,001	T	TE	
RV 17347	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4
RV 17745	0/4	0/4	1/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
RV 27995	0/4	0/4	1/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
RV 28000	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4

de liaison (90 p. 100 (27)) du miconazole aux protéines sériques.

2. Activité bactéricide

Matériel et méthodes

L'activité bactéricide du miconazole a été testée en utilisant les méthodes décrites par VANBREUSEGHEM (34).

Cinq dilutions décimales de miconazole dans l'éthanol 95 p. 100 sont réalisées. Elles contiennent respectivement 10 mg/ml dans l'éthanol 9,5 p. 100, 1 mg/ml dans l'éthanol 0,95 p. 100, 0,1 mg/ml dans l'éthanol 0,095 p. 100, 0,01 mg/ml dans l'éthanol 0,0095 p. 100 et 0,001 mg/ml dans l'éthanol 0,00095 p. 100.

De petits fragments de colonies de *D. congolensis* âgés de 5 jours sur BHI Agar, sont découpés avec une petite partie du milieu et immergés dans le miconazole dilué pendant 5, 10, 30, 60 mn. Après l'immersion, ils sont lavés dans l'eau distillée et reensemencés dans le BHI liquide.

La température d'incubation et la durée de l'expérience sont les mêmes que précédemment.

Résultats et discussion

Le tableau III contient les résultats enregistrés après 14 jours d'incubation. On notera que : l'éthanol à 9,5 p. 100 ou à des concentrations plus basses n'a aucune influence sur la croissance de *D. congolensis*.

TABL. N°III-Activité bactéricide du Miconazole sur *Dermatophilus congolensis*

Concentration du Miconazole en mg/ml	Durée d'immersion de <i>Dermatophilus</i> dans le Miconazole			
	5 mn	10 mn	30 mn	60 mn
10	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{0}{4}$	$\frac{0}{4}$
1	$\frac{2}{4}$	$\frac{2}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{0}{4}$
0,1	$\frac{3}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{2}{4}$
0,01	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$
0,001	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$
Témoins	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$

:: Les témoins sont constitués de tubes contenant des dilutions d'éthanol 9,5 p. 100 à 0,00095 p. 100

A la concentration de 10 mg/ml, un effet bactéricide complet est observé après 30 mn de

contact ; à celle de 1 mg/ml, on note l'effet bactéricide après 60 mn de contact.

A la concentration de 0,01 mg/ml, plus aucun effet bactéricide n'apparaît.

Il est important de signaler que pour des concentrations et des durées de contact non bactéricide, il y a cependant une nette diminution du nombre de zoospores produites.

B. ESSAIS IN VIVO

Matériel et méthodes

Comme animal d'expérience, nous avons, après des essais préliminaires d'inoculation à la souris (OF1 : oncin France), au cobaye, au hamster et au lapin (28), choisi la souris blanche surtout pour des raisons de commodité. Cependant, comme l'ont montré d'autres auteurs (17, 16, 21) le lapin est plus réceptif au *D. congolensis*.

Au cours des mêmes essais, 3 souches de *D. congolensis* avaient été utilisées. La souche RV 28000 riche en zoospores s'étant montrée la plus virulente, nous l'avons choisie.

Mode d'inoculation

Deux voies d'inoculation ont été utilisées :

— Badigeonnage. Bien que cette technique ne donne que peu de résultats, nous l'avons cependant utilisée. Des cultures âgées de 5 jours sur BHI Agar à 37 °C sont broyées dans un Griffith et mélangées à du miel. Ce mélange est appliqué à l'aide d'une spatule sur le dos des souris mâles, pesant de 20 à 22 g, préalablement épilées manuellement sur une surface d'environ 4 cm².

— Inoculation sous-cutanée.

Des colonies âgées de 5 jours sur BHI Agar à 37 °C, sont mises en suspension dans l'eau distillée (environ 2 g dans 5 ml) et homogénéisées. Une dose de 0,1 ml de cette suspension est injectée par la voie sous-cutanée sur le flanc droit de chaque souris, pesant de 20 à 22 g, et tondu sur une surface d'environ 4 cm².

Traitement :

— Local.

Le miconazole est mélangé avec du polyéthylène glycol 400 de façon à réaliser une microsuspension contenant 2 p. 100 de substance active. Le traitement a débuté 1 jour après l'inoculation ; 1 g environ de l'onguent est appliqué

chaque jour sur les sites d'inoculation pendant 7 jours.

— *Per os.*

Le miconazole est mélangé avec 1 ml de polyéthylène glycol 200, 1,33 p. 100 de gélose et 6,7 p. 100 de glucose de façon à réaliser une concentration de 128 mg de miconazole pour 4 ml de la solution finale.

Tous les matin et soir, chaque souris reçoit à l'aide d'une petite sonde montée sur une seringue de 1 ml, 0,05 ml de ce mélange pendant 14 jours. Le traitement a débuté immédiatement après l'inoculation de *D. congolensis*.

Schéma de l'expérience :

Groupe	Nombre de souris	Mode d'inoculation	Traitement
I	10	Badigeonnage	Néant
II	10	Badigeonnage	Local pendant 7 j
III	30	Sous-cutané	Néant
IV	30	Sous-cutané	Oral pendant 14 j

Résultats :

Groupe I et groupe II : sur 20 souris inoculées, 6 seulement ont développé des lésions spécifiques de la dermatophilose, soit 2 souris pour le groupe I et 4 souris pour le groupe II. Toutes ces lésions ont évolué de la même façon dans les deux groupes, la guérison spontanée intervenant vers le 7^e jour.

Groupe III et groupe IV : des lésions sous-cutanées se présentant sous forme de nodules apparaissent 48 h après l'inoculation. Ces nodules sont bien circonscrits et présentent un aspect mou.

Après 7 jours, les 2 groupes montrent des nodules plus consistants et adhérents à la peau.

Après 14 jours, la plupart des nodules ont

disparu. Néanmoins, 3 nodules persistent dans le groupe III et 5 nodules dans le groupe IV.

Au 15^e jour, les souris ont été sacrifiées. Des rétrocultures ont donné les résultats suivants :

groupe III : 3 rétrocultures positives

groupe IV : 4 rétrocultures positives.

DISCUSSION ET CONCLUSION

A côté d'un effet bactériostatique, nous avons également mis en évidence un effet bactéricide *in vitro*. Cependant, celui-ci ne se manifeste qu'à des concentrations relativement élevées (10 mg/ml pendant 30 mn).

L'activité bactéricide constatée vis-à-vis des zoospores mérite d'être soulignée puisque c'est à celles-ci qu'on attribue la transmission de la maladie (22, 23).

L'activité bactéricide constatée vis-à-vis des zoospores mérite d'être soulignée puisque c'est à celles-ci qu'on attribue la transmission de la maladie (22, 23). Nos essais *in vivo* sont assez décevants puisque nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence entre les groupes traités et les groupes témoins. Pour ce qui concerne l'inoculation par badigeonnage, on peut l'expliquer par l'inconstance et le caractère fugace des lésions observées. Par contre, l'inoculation par la voie sous-cutanée offre le double avantage de la constance et de la durée des lésions. Comme l'avait suggéré VANBREUSEGHEM (1977), suite aux essais réalisés par SELLY (26), cette voie pourrait servir de modèle expérimental pour des tests de médicaments *in vivo*.

Il est possible qu'avec un plus grand nombre d'animaux, un autre schéma thérapeutique et une durée d'observation plus longue, un effet favorable puisse être mis en évidence.

En conclusion, les résultats observés *in vitro* — effets bactériostatiques, bactéricides et anti-zoospores — nous incitent à penser que le miconazole mériterait d'être essayé dans les conditions naturelles au cours d'épizootie chez le bétail.

SUMMARY

Experimental study on *Dermatophilus congolensis* ; its sensitivity to miconazole

Miconazole (Janssen Pharmaceutica - Belgium) exhibits a bacteriostatic (MIC : 0,1-10 µg/ml) and bactericidal (10 mg/ml for 30 mn. - 1 mg/ml for 60 mn.) activity against *Dermatophilus congolensis in vitro*.

Although, subcutaneous inoculation into white mice seems a good experimental model, therapeutic activity was not demonstrated *in vivo*.

RESUMEN

Estudio experimental de *Dermatophilus congolensis* y de su sensibilidad al miconazole

Se demuestra *in vivo* la acción bacteriostática y bactericida del Miconazole sobre *Dermatophilus congolensis*.

La inoculación por vía subcutánea en el ratón blanco parece un buen modelo experimental.

No se pudo evidenciar la actividad terapéutica del Miconazole.

BIBLIOGRAPHIE *

2. BLANCOU (J. M.). Traitement de la streptothricose bovine par une injection unique d'antibiotique à haute dose. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1969, **22** (1) : 34-40.
3. BOTTER (A. A.). Topical treatment of nail and skin infections with miconazole, a new broad-spectrum antimycotic. *Mycosen*, 1971, **14** : 187-191.
4. BRUGMANS (J.), VAN CUTSEM (J.), THIENPONT (D.). Treatment of long-term tinea pedis with miconazole. *Arch. Derm., Chicago*, 1970, **102** : 428-432.
6. CHAMOISEAU (G.) et LEFEVRE (E.). Recherches immunologiques sur la dermatophilose cutanée bovine. I. Essai d'immunisation du lapin contre la dermatophilose expérimentale. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1973, **26** (1) : 1-5.
7. CHAMOISEAU (G.), PROVOST (A.), TOUADE (M.). Recherches immunologiques sur la dermatophilose cutanée bovine. II. Essai d'immunisation du zébu contre la dermatophilose naturelle. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1973, **26** (1) : 7-11.
13. KAMMERLOCHER (A. A.), MAMO (E.). Evaluations of drugs effective against streptothricosis. *VM/SAC*, 1965, **60** : 65.
15. LEVINE (H. B.), STEVENS (D. A.), COBB (J. M.), GEBHARDT (A. E.). Miconazole in coccidioidomycosis. I. Essays of activity in mice and *in vitro*. *J. infect. Dis.*, 1975, **132** : 407.
18. PERREAU (P.), CHAMBRON (J.). Immunologie de la streptothricose cutanée des bovins Essais de vaccination. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1966, **19** (3) : 263-274.
25. ROBERTS (D. S.). Chemotherapy of epidermal infection with *Dermatophilus congolensis*. *J. comp. Path.*, 1967, **77** (2) : 129-136.
26. SELLY (M.). Etude sur le *Dermatophilus congolensis*. Thèse Inst. Méd. Trop. Anvers - Dép. Mycologie. 1973.
27. STEVENS (M. D.), DAVID (A.), LEVINE (H. D.), STANLEY (C.), DERESINKI (M. D.). Miconazole in coccidioidomycosis. II. Therapeutic and pharmacologic studies in Man. *Am. J. Med.*, 1976, **60** : 191-202.
28. TCHALIM (T. K.). *Dermatophilus congolensis* Van Saceghem, 1915 : Quelques observations *in vivo* et *in vitro*. Thèse Inst. Méd. Trop. Dép. Mycologie. 1977.
29. THIERY (G.), MEMERY (G.). La streptothricose cutanée. IV. Etiologie traitement - prophylaxie. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1961, **14** (4) : 413-427.
34. VANBREUSEGHEM (R.), VAN CUTSEM (J.), THIENPONT (D.). Experimental study of a new fungistatic Agent. R 10100 1-(1, 2, 3, 4-tetrahydro-1-naphthyl)-5-(ethoxy carbonyl)-imidazole nitrate. *Chemotherapy*, 1967, **12** (2) : 107-122.
35. VANBREUSEGHEM (R.), TAKASHIO (M.), NAGEH (M.), PRESLER (D.), SELLY (M.), VAN WETTERE (P.). Some experimental research on *Dermatophilus congolensis* Int. Symp. on *Dermatophilus* infection, Ibadan, 25-28 June 1973.
36. VAN CUTSEM (J. M.), THIENPONT (D.). Miconazole, a broadspectrum antimycotic agent with antibactericidal activity. *Chemotherapy*, 1972, **17** : 392-404.

* La bibliographie complète (40 réf.) sera communiquée aux personnes qui en feront la demande auprès de la Rédaction de la Revue.