

Étude préliminaire de l'association isoniazide-épiroprim dans un modèle murin de tuberculose.

K. N'guessan (1)*, M. Dosso (1), G. Marchal (2), P. Chavarot (2), F. Romain (2), P. Pescher (2) & Edy (2)

(1)Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

(2)Institut Pasteur à Paris, France.

* Laboratoire de bactériologie-virologie, 01 BP 490, Abidjan 01, Côte d'Ivoire. Tél : 22 48 74 05, Fax : 22 48 74 05, E-mail : ngueskr@yahoo.fr

Manuscrit n°2412. "Thérapeutique". Reçu le 12 mars 2002. Accepté le 18 septembre 2002.

Summary: Preliminary study of isoniazid-epiroprim association in tuberculosis murine model.

The purpose of this study regarding isoniazid-epiroprim's association applied to antituberculosis chemotherapy, carried through murine model, initiated into Institut Pasteur of Côte d'Ivoire and worked out at Institut Pasteur of Paris was to evaluate the epiroprim's effect alone and associated with isoniazid on *Mycobacterium tuberculosis*. Sixteen mice (lineage C57Bl/6) were inoculated by venous way with 10^5 viable bacillus (strain H37Rv) suspended in 500 μ l sterile physiological aqueous solution and were shared out into 4 sets. Fifteen days later the sets have been submitted or not to a daily treatment by gavage during three weeks (epiroprim, isoniazid, isoniazid plus epiroprim). The mice were euthanased, spleen and lung were removed from each animal. The titres of determined bacillus into those organs prove that isoniazid and epiroprim associated seem more efficacious than the isoniazid monotherapy for mice pulmonary tuberculosis. Bacillus obtained are sensitive to isoniazid.

Résumé :

Cette étude de chimiothérapie antituberculeuse expérimentale de l'association isoniazide-épiroprim dans un modèle murin initiée à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et réalisée à l'Institut Pasteur à Paris avait pour objectif d'évaluer l'effet de l'épiroprim, un inhibiteur de la dihydrofolate reductase seul et en association avec l'isoniazide sur *Mycobacterium tuberculosis*. Seize souris (lignée C57Bl/6) recevant chacune par voie veineuse un inoculum contenant 10^5 bacilles viables (souche H37Rv) en suspension dans 500 μ l de soluté physiologique stérile ont été réparties en quatre lots. Quinze jours après l'inoculation, les lots ont été pendant trois semaines soumis ou non à un traitement journalier (épiroprim, isoniazide, isoniazide +épiroprim) par gavage. Au terme du traitement, les souris ont été euthanasiées, la rate et le poumon prélevés chez chaque animal. Les titres de bacilles déterminés dans ces organes montrent que l'association isoniazide-épiroprim semble plus efficace que la monothérapie à l'isoniazide pour le traitement de la tuberculose pulmonaire de la souris. Les bacilles obtenus à partir de ces organes sont sensibles à l'isoniazide.

Mycobacterium tuberculosis
épiroprim
isoniazid
tuberculosis
antituberculous chemotherapy
murin model

Mycobacterium tuberculosis
épiroprim
isoniazide
tuberculose
chimiothérapie tuberculeuse
modèle murin

Introduction

La prévention des infections opportunistes chez les personnes infectées par le VIH reposant sur l'association d'un sulfamide et du triméthoprime est efficace (1, 11). Le recours systématique à la chimioprophylaxie a entraîné, notamment en Afrique, l'émergence de souches bactériennes résistantes (11). L'une des alternatives thérapeutiques pour remédier à cette situation a été de proposer de nouvelles molécules. C'est le sens de l'emploi de l'épiroprim (EPM; Ro 118958, Ltd F. Hoffman-La Roche). L'épiroprim, molécule de synthèse, est un puissant inhibiteur de la dihydrofolate reductase (DHFR) des bactéries (4, 9, 10). Il peut être utilisé seul ou en association (4, 9). Certaines de ses propriétés dont l'inhibition de la DHFR de *Mycobacterium avium* (10), l'association synergique avec l'isoniazide *in vitro* sur *M. tuberculosis*(5) et le résultat des travaux de LI sur la structure tri-dimensionnelle de la DHFR de *M. tuberculosis*(8) ont incité à initier cette étude prélimi-

naire de chimiothérapie antituberculeuse expérimentale dans un modèle murin. Elle avait pour objectif d'évaluer l'effet de l'EPM seul et en association avec l'INH chez des souris qui ont reçu par voie veineuse la souche H37Rv de *M. tuberculosis*

Matériel et méthodes

Un inoculum de 10^5 bacilles tuberculeux viables/500 μ l de soluté physiologique stérile est inoculé par voie veineuse à la lignée de souris C57Bl/6 (animalerie de l'Institut Pasteur à Paris) après une immobilisation dans un système de contention. L'inoculum est obtenu d'une sub-culture de la souche H37Rv (N° 99-0215, de la collection de l'Institut Pasteur à Paris) dans un milieu de Sauton dilué au 1/4 tamponné (Institut Pasteur) contenant du Tween 80 (Prolabo). Après trois semaines de culture en aérobiose à 37 °C, le voile bacillaire est recueilli, mis en suspension dans du soluté physiologique stérile. Homogénéisées à la pipette, des aliquotes de

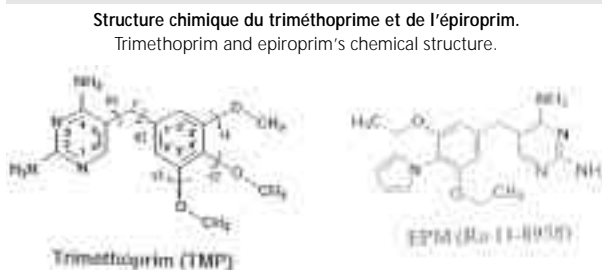
1 ml de la suspension bacillaire sont constituées. Le titre bacillaire de l'aliquote est déterminé. Une gamme de dilution de raison géométrique 2 est réalisée (1/2 à 1/128) ; 0,4 ml de chaque dilution est mis en culture sur une boîte de Pétri (90 mm de Ø) qui contient du 7H11 (Difco) additionné d'OADC (Becton-Dickinson) (deux boîtes par dilution). On étale l'inoculum à l'aide d'un râteau stérile. Les boîtes emballées dans du papier aluminium sont mises dans une étuve à 37 °C en aérobiose pendant trois semaines. Après 21 jours, on énumère le nombre de colonies sur chaque boîte par dilution. Les boîtes qui contiennent 20 à 200 colonies comptables sont sélectionnées.

Le titre de bacilles viables est déterminé par application de la formule : nombre de bacilles viables/ml = N.d. V_i/V_e . (N = nombre de colonies ; d = titre de la dilution ; V_i = Volume initial ; V_e = Volume ensemencé). Les aliquotes sont titrées à 10^8 bacilles viables/ml. Une dilution au centième permet de calibrer l'inoculum à 10^5 bacilles viables/500 µl de soluté physiologique stérile.

Seize souris femelles pesant chacune 20g, infectées, réparties en quatre lots, sont placées dans un poste de sécurité microbiologique de type III. Deux semaines après l'inoculation, les lots sont soumis à un traitement quotidien par gavage cinq jours par semaine pendant trois semaines :

- le lot des témoins est constitué de deux souris qui ont reçu chacune 0,5 ml de soluté physiologique stérile par jour ;
- un lot constitué de quatre souris dont chacune a reçu 25 mg/kg/j d'isoniazide (Sigma) dissout dans 0,5 ml d'eau distillée stérile ;
- un lot constitué de cinq souris recevant chacune 50 mg/kg/j d'épiroprim (Hoffman-La Roche) dissout dans 0,5 ml d'eau distillée stérile contenant 5 % d'éthanol et 0,1 % de Tween 20 ;
- un dernier lot de cinq souris, dont chacune reçoit simultanément de l'épiroprim (50 mg/kg/j) et de l'isoniazide (25 mg/kg/j) préparé extemporanément et respectivement contenu dans 0,25 ml d'eau distillée stérile.

Figure 1



L'alimentation en eau est suspendue une demi-heure avant l'administration des médicaments.

Au terme du traitement, les souris sont euthanasiées par du dioxyde de carbone. Le poumon (les deux lobes) et la rate sont prélevés chez chaque animal après dissection.

Dans une fiole capuchonnée de 2 ml (Polylabo) contenant une bille métallique (10mm Ø), on dépose la totalité de l'organe, on ajoute 1ml d'un milieu de Sauton dilué au 1/4 tamponné (Institut Pasteur) contenant du Triton x 100 (Prolabo) dilué au 1/100. L'organe est broyé pendant 3 minutes à la vitesse de 10 agitations/mn (mini-beadbeater, Polylabo). Tout l'extrait d'organe prélevé est mis en suspension dans 5ml de Sauton dilué tamponné.

0,2 ml d'extraits d'organe est mis en culture sur un milieu de Loëwenstein-Jensen (2 tubes). L'autre volume sert à réaliser une gamme de dilution à base 3 (1/3 à 1/59064) ; 0,4 ml de chaque dilution est respectivement mis en culture sur deux boîtes de Pétri contenant un milieu de Middelbrook 7H11 (Difco) additionné d'OADC (Becton-Dickinson). Les boîtes, emballées

dans du papier aluminium, sont mises à 37 °C pendant 21 jours. Les titres bacillaires sont déterminés comme précédemment décrit. Les milieux de Loëwenstein-Jensen contenant plus de 1 000 colonies sont choisis pour déterminer le taux de bacilles mutants, déterminé par la méthode de CANETTI et GROSSET à différentes concentrations critiques d'isoniazide.

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel SigmaPlot version 5 de SPSS Inc. (Chicago). Ce logiciel de représentations graphiques et de calculs (statistique, transformations mathématiques...) a permis le calcul de la moyenne géométrique.

Résultats

Résultats généraux

Avant la dissection

Les 16 souris ont survécu après l'inoculation du bacille tuberculeux. Elles ne sont pas devenues chétives et leur pelage est resté lisse. Elles sont restées agglutinées les unes sur les autres.

Après dissection

À l'examen macroscopique du poumon, on ne décèle ni foyer nécrotique, ni réduction du volume de cet organe. Toutefois, il révèle une augmentation modérée du volume de la rate chez toutes les souris.

Calcul des titres bacillaires dans les organes

Dans la rate de la quatrième souris qui a été simultanément traitée par de l'INH et de l'EPM, 12022,6 bacilles de la souche H37Rv ont été dénombrés, soit 4,08 Log₁₀ (tableau I). Dans le poumon de la première souris du lot soumise à la monothérapie à l'INH, 489,8 bacilles de la souche H37Rv ont été dénombrés, soit 2,69 Log₁₀ (tableau II).

Tableau I

Titres de *M. tuberculosis* dans la rate par souris des différents lots.
M. tuberculosis titres in the spleen per mouse of different sets.

lots	nb bacilles viables (Log ₁₀ /rate/souris)			
témoins (n =2)	S ₁ = 4.06	S ₂ = 4.72		
INH (n =2)	S ₁ = 3.01	S ₂ = 3.06		
EPM (n =4)	S ₁ = 2.94	S ₂ = 3.76	S ₃ = 4.25	S ₄ = 4.69
INH +EPM (n =4)	S ₁ = 2.85	S ₂ = 3.63	S ₃ = 4.05	S ₄ = 4.08

S_n = désignation du numéro de la souris d'un lot quelconque
n = nombre d'extraits de rate dont le volume est suffisant pour être mis en culture après le broyage mécanique.

Tableau II

Titres de *M. tuberculosis* dans le poumon par souris des différents lots.
M. tuberculosis titres in the lung per mouse of different sets.

lots	nb bacilles viables (Log ₁₀ /poumon/souris)			
témoins (n =2)	S ₁ = 4.04	S ₂ = 4.42		
INH (n =4)	S ₁ = 2.69	S ₂ = 2.75	S ₃ = 3.14	S ₄ = 3.96
EPM (n =4)	S ₁ = 2.80	S ₂ = 4.04	S ₃ = 4.08	S ₄ = 4.21
INH +EPM (n =4)	S ₁ = 2.53	S ₂ = 2.61	S ₃ = 2.65	S ₄ = 2.75

S_n = désignation du numéro de la souris d'un lot quelconque
n = nombre d'extraits de poumons dont le volume est suffisant pour être mis en culture après le broyage mécanique.

Résultats analytiques

Les titres moyens de bacilles déterminés dans le lot de souris traitées par l'EPM ne sont pas significativement diminués par rapport aux témoins (fig. 2 et 3).

Les titres moyens déterminés chez les souris soumises à la monothérapie (INH) sont inférieurs à ceux obtenus dans le lot de souris ne recevant aucun traitement, tant au niveau de la rate que du poumon (fig. 2 et 3).

Au niveau du poumon, l'effet de l'association médicamenteuse sur le bacille tuberculeux semble équivalent à celui de l'INH (fig. 3) ; au niveau de la rate, c'est l'effet contraire de ces médicaments qui est observé (fig. 2).

Figure 2

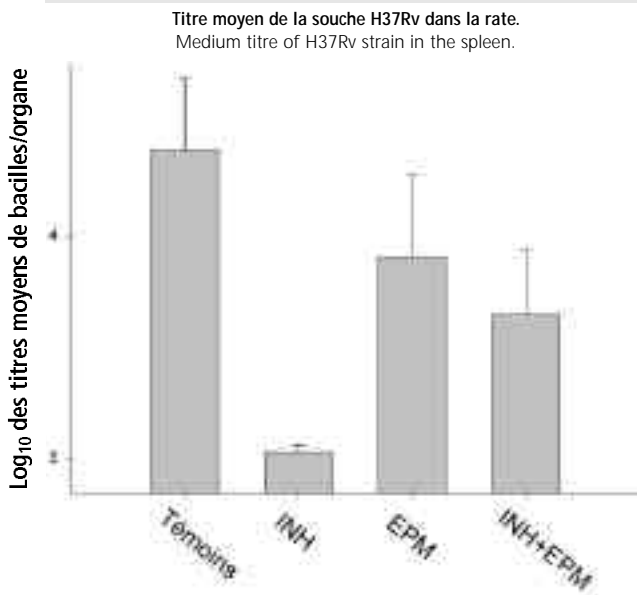
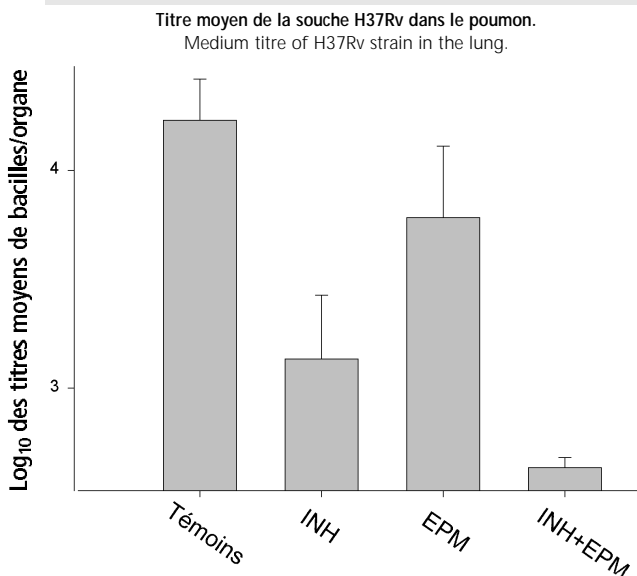


Figure 3



Évaluation de la sensibilité à l'INH des bacilles isolés dans les organes

Des 30 extraits d'organes ensemencés sur un milieu de Loëwenstein-Jensen, 9 extraits de rate (23 %) ont donné plus de 1 000 colonies.

Les taux de mutants résistants sont observés sur les milieux de Loëwenstein-Jensen qui renferment des concentrations critiques d'INH, au plus égales à 0,2 µg/ml (tableau III).

Tableau III

Taux de mutants résistants à l'INH chez les souris traitées et non traitées.
Mutants rate resisting at INH on treated and untreated mice.

traitement	concentrations critiques d'INH (µg/ml)					
	0,05	0,1	0,2	0,5	1	10
aucun	-	-	-	-	-	-
INH ₃	0,33 %	-	-	-	-	-
INH ₄	0,83 %	0,05 %	-	-	-	-
EPM ₁	0,29 %	-	-	-	-	-
EPM ₃	0,4 %	0,01 %	0,03 %	-	-	-
EPM ₄	0,4 %	-	0,03 %	-	-	-
INH + EPM ₁	0,94 %	-	-	-	-	-
INH + EPM ₂	0,19 %	-	-	-	-	-
INH + EPM ₃	2,60 %	-	-	-	-	-

Commentaire

Effet de l'INH seul

L'INH a été prescrit à la dose de 25 mg/Kg/jour en monothérapie et en association pour le traitement de la tuberculose chez les souris. Les effets de l'INH sur le bacille sont traduits par une baisse des titres de bacilles (fig 2 et 3). Concernant la monothérapie à l'INH, nos résultats sont modestes rapportés à ceux de CANETTI, GROSSET et GRUMBACH *et al.* (3, 6, 7). Ce traitement court d'une durée de 15 jours expliquerait le peu d'effets de l'isoniazide sur le bacille de la tuberculose. En outre, il constitue un handicap quant à l'émergence de mutants résistants liés à la pression de sélection exercée par la monothérapie à l'isoniazide.

Effet de l'épiroprim seul

Quinze jours de traitement nous paraissent insuffisants pour évaluer l'effet bactériostatique de l'EPM sur les bactéries (4, 9, 10), d'autant qu'il s'agit du bacille tuberculeux dont le temps de génération est d'une vingtaine d'heures. Toutefois, les variations des titres moyens de bacilles dans les organes des souris traitées par l'EPM, bien que non significatives (fig. 2 et 3), semblent évoquer une inhibition probable de la DHFR de *Mycobacterium tuberculosis* par l'EPM (8).

Association INH et épiroprim

L'association INH + EPM paraît dans une certaine mesure plus efficace que la monothérapie à l'INH lors du traitement de la tuberculose pulmonaire de la souris (fig. 3). Elle est moins efficace dans le traitement de la tuberculose extra-pulmonaire de la souris (7). L'écart observé entre les titres déterminés dans le poumon de souris traitées par l'INH en monothérapie et l'association INH + EPM pourrait être lié à l'effet propre de l'EPM sur le bacille (fig. 2 et 3). Les résultats de cette association médicamenteuse pourraient être perçus comme l'effet additif éventuel de chacun des médicaments utilisés dans le traitement de la tuberculose pulmonaire de la souris (5, 8). Ces résultats doivent être confirmés lors d'un essai proprement dit.

Étude de la sensibilité des bacilles à l'isoniazide

Les taux de mutants résistants à l'INH des bacilles obtenus à partir d'extraits d'organe sont faibles en général. Cette grande sensibilité des bacilles à l'INH s'explique d'une part par les caractères biologiques de la souche H37Rv (2, 3, 6, 7) et par la durée du traitement d'autre part.

Remerciements

Dr Louis HALLER, Directeur de la Fondation Roche-Afrique pour la recherche; Pr Armand EHOUMAN, Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire; Dr Véronique VINCENT, Laboratoire de référence des mycobactéries de l'Institut Pasteur à Paris; Pr Mireille DOSSO, Chef de service du laboratoire de bactériologie-virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Références bibliographiques

1. ANGLARET X, CHENE G, ATTIA A, TOURE S, LOFONT S *et al.* - Early chemoprophylaxis with Trimethoprim-Sulfamethoxazole for HIV-1 infected adults in Abidjan, Côte d'Ivoire: a randomised trial. *Lancet*, 1999, **353**, 1463-1468.
2. CANETTI G - Modifications des populations des foyers tuberculeux au cours de la chimiothérapie antituberculeuse. *Ann Inst Pasteur*, 1959, **97**, 53-79.

3. CANETTI G, RIST N & GROSSET J - Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev Tuberc Pneumol*, 1963, **27**, 217-272.
4. CHANG HR, ARSENIJEVIC D & COMTE R - Activity of epiroprim (Ro 11-8958), a Dihydrofolate reductase Inhibitor, Alone and in Combination with Dapsone. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, **38**, 1803-1807.
5. DOSSO M, OUATTARA L, CHERIF MA, BOUZID SA, HALLER L & FERNEX M - Experimental *in vitro* efficacy study on the interaction of epiroprim plus isoniazid on *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemother*, 2001, **47**, 123-127.
6. GROSSET J & JI B - Experimental chemotherapy of Mycobacterial diseases. In: GANGADHARAM PRG, JENKINS PA, (Eds) - *Mycobacteria II chemotherapy*. Chapman & Hall. New-york, 1998, pp.51-97.
7. GRUMBACH F - Etudes chimiothérapiques sur la tuberculose avancée de la souris. *Progr Explor Tuberc*, 1965, **14**, 31-96.
8. LI S, SIRAWAROPORN R, CHITNUMSUB P, SIRAWAROPORN W, WOOLEN J *et al.* - Three-Dimensionnal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Dihydrofolate Reductase Reveals opportunities for the Design of novel Tuberculosis drugs. *J Mol Biol*, 2000, **295**, 307-323.
9. LOCHER HH, SCHLUNEGGER H, HARTMAN GP, ANGERHRN P & THEN R - Antibacterial Activities of Epiroprim, a New Dihydrofolate reductase Inhibitor, Alone and in Combination with Dapsone. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, **40**, 1376-1381.
10. THEN RL, HARTMAN PG, KOMPIS I, STEPHAN-GULDNER M & STOCKEL K - Epiroprim Ro 11-8958. *Drugs of the Future*, 1994, **19**, 446-449.
11. WIKTOR SZ, SASSAN-MOROKRO M, GRANT AD, ABOUYA L, KARON JM *et al.* - Efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis to decrease morbidity and mortality in HIV-1 infected patients with tuberculosis in Abidjan, Côte d'Ivoire: a randomised controlled trial. *Lancet*, 1999, **353**, 1469-1475.