



HAL
open science

ESSAIS BIOLOGIQUES DES MEDICAMENTS ANTHELMINTHIQUES DETERMINATION DE LA DE 50

G. Luffau, C. Carrat, P.W. Borgaonkar

► **To cite this version:**

G. Luffau, C. Carrat, P.W. Borgaonkar. ESSAIS BIOLOGIQUES DES MEDICAMENTS ANTHELMINTHIQUES DETERMINATION DE LA DE 50. Annales de Recherches Vétérinaires, 1982, 13 (4), pp.309-319. hal-00901387

HAL Id: hal-00901387

<https://hal.science/hal-00901387>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ESSAIS BIOLOGIQUES DES MEDICAMENTS ANTHELMINTHIQUES DETERMINATION DE LA DE 50

G. LUFFAU ¹, C. CARRAT ¹ et P.W. BORGAONKAR ²

¹ : Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie, INRA,
78850 Thiverval-Grignon, France

² : Bharatiya Agro-Industries Foundation, Poona, Inde

Summary

BIOLOGICAL ASSAYS OF ANTHELMINTICS. DETERMINATION OF DE 50. — Experiments on ivermectine, thiabendazole and levamisole were performed by using the *Nippostrongylus brasiliensis* rat model. The aim of the experiments was to study the 50 % as well as 99.5 % doses of the above anthelmintics. Besides this a relative evaluation of drugs was also carried out and different dose efficiencies were compared by keeping one anthelmintic as a standard. The results were obtained on the following experimental conditions : homogeneity of the group of rats (age, weight and sex), uniform infestation in all the animals (3 000 larvae at day zero), administration of anthelmintics was done on day 6 and autopsy was performed on the 9th day of infection. The effectivity of anthelmintic is essentially based on the mortality of the adult worms. The mathematical expression is obtained on the basis of logarithmic values of the doses and probit percentage analysis. The graph obtained between dose vs efficiency is a straight line, so the value of DE 50 can be calculated using this straight line. The normal distribution of worms exposed to a dose was verified which justifies the statistical interpretation.

La dose efficace 50 (DE 50) est un paramètre qui caractérise l'activité biologique des substances utilisées comme médicament (Grab, 1982 ; Gros *et al.*, 1981 ; Aubert, 1980 ; Blancou *et al.*, 1980 ; Stellmann et Terre, 1965) ; on la définit comme la dose théoriquement capable de provoquer 50 % de succès attendus. Cette donnée pourrait être utilisée avantageusement pour définir l'activité anthelminthique d'une molécule à côté d'autres tests qui sont proposés : « critical test » (Hall et Foster, 1918) « controlled test » (Gibson, 1963 ; Moskey et Harwood, 1941) ou plus récemment des tests faisant appel à des transformations statistiques (Egerton *et al.*, 1963). Les auteurs utilisent pour ces tests les

animaux domestiques auxquels sont destinés les médicaments, mais également des rongeurs de laboratoire (Baker, 1963).

Nous avons utilisé le rat pour estimer la DE 50 (puis par extrapolation les doses efficaces à 95 %, DE 95 ; à 99,5 %, DE 99,5) de trois anthelminthiques : l'ivermectine, le lévamisole et le thiabendazole. Le but de cette série d'expériences était de mettre au point une méthodologie d'appréciation de l'efficacité des anthelminthiques. la méthode consiste à administrer différentes doses de ces substances à des rats infestés par *Nippostrongylus brasiliensis*, puis à apprécier le pourcentage (exprimé en probit) du

nombre de vers tués en fonction de la dose de médicament. On trace alors la courbe dose-effet. A partir de la droite (obtenue après transformation mathématique) (Schwartz, 1963 ; Valleron et Lazar, 1966) on détermine la valeur de la DE 50 et, éventuellement, celle de la DE 95 et celle de la DE 99,5.

Matériel et Méthodes

1. Méthodes statistiques

1.1. Etablissement de la droite dose-effet

En soumettant des populations de parasites (groupes de rats infestés) à des doses croissantes d1, d2, etc., d'une substance à activité anthelminthique, on observe des pourcentages croissants p1, p2, etc., de mortalité dans ces populations (pourcentages de parasites tués chez des rats infestés et traités). La relation existant entre les doses et les effets qu'elles entraînent se représente sous forme d'une courbe d'allure sigmoïde (fig. 1). La transformation en logarithme des doses et en probit des effets (table de conversion des pourcentages en probit) (Finney, 1951) permet d'obtenir une droite (fig. 3). Le tracé de cette droite se fait approximativement en accordant un « poids » plus grand aux points voisins du probit 5 correspondant à un pourcentage de 50 %.

1.2. Ajustement à la droite du maximum de vraisemblance

La valeur y' du probit pour une dose donnée est lue sur cette droite tracée à vue. Une valeur y' , ou « probit de travail » est déterminée à partir des tables établies en tenant compte des « poids » respectifs de chaque point (Lellouch et Lazar, 1974 ; Finney, 1978). Les probits de travail permettent d'établir une équation de la droite dose-effet d'où un nouveau tracé (fig. 3). Plusieurs ajustements successifs, ou itérations, peuvent être nécessaires pour obtenir la stabilité des paramètres de l'équation de la droite.

La linéarité est vérifiée par le test du χ^2 entre les pourcentages théoriques estimés à partir de la droite et les pourcentages effectivement observés (Lellouch et Lazar, 1974 ; Schwartz et al., 1970).

1.3. Détermination des doses efficaces

Les doses efficaces sont lues à partir de la droite la plus vraisemblable. La dose correspondant au probit de 50 % est la dose efficace à 50 % dite « DE 50 » ; celle au probit de 95 %, la dose efficace à 95 %, dite « DE 95 » et celle au

probit de 99,5 % la dose efficace à 99,5, dite « DE 99,5 » (fig. 2).

2. Protocole expérimental

2.1. Constitution des groupes

Des rats de souche Lewis, provenant à l'origine du Wistar Institute (Philadelphia) ont été reproduits à la station de recherches de Virologie et d'Immunologie (INRA, Thiverval-Grignon). L'élevage se fait dans des cages métalliques dont le fond est constitué par un caillebotis. Les animaux sont nourris *ad libitum* avec des aliments composés et stérilisés (Moulin de la Minière, INRA, Guyancourt). Ils ne sont utilisés pour les expériences qu'à partir de l'âge adulte (12 semaines environ) ; ils pèsent alors 200 à 300 g selon le sexe.

Avant chaque expérience, les rats sont pesés individuellement ; on détermine ainsi un poids moyen qui fluctue dans les limites indiquées au risque consenti de 5 %. Nous avons vérifié que la répartition du poids des animaux dans la population suivait une loi normale.

La distribution des animaux dans les groupes est alors faite par tirage au sort. Le nombre d'animaux constituant le groupe témoin associé à chaque expérience est calculé selon la formule $N \sqrt{k}$ où N est le nombre d'animaux dans chaque groupe traité, et k le nombre de doses utilisées.

2.2. Traitements

Trois produits ont été utilisés sous leur présentation commerciale. Le lévamisole (ou DL-6-phényl-2, 3,5,6-tétrahydro-imidazo [2,1-b] thiazole ou l-tetramisole) a été employé sous forme de chlorhydrate sous deux présentations, l'une injectable contenant 0,007 g/ml (Némisol 0,7 %, Spécia, Paris), l'autre buvable à 0,015 g/ml (Anthesol 1,5 %, Specia, Paris). Le thiabendazole (ou 2-(4-thiazolyl)-1H-benzimidazole) se présentait sous forme de poudre à 50 % de produit actif (Thibenzole, MSD, Rahway). L'ivermectine (Ivomec, MSD, Rahway) se présentait en solution à 1 % dans le formol glycérolique et le propylène glycol.

La dose d'anthelminthique est calculée d'après le poids moyen des animaux ; elle est la même pour tous les individus d'un groupe donné.

Quelle que soit la dose ou la voie d'administration, le volume du produit était 1 ml.

L'administration du médicament par voie sous-cutanée a été faite par injection dans le creux de l'aîne avec une seringue de 1 ml et une aiguille de 11/10 mm de diamètre, 2,5 cm de longueur. Le lévamisole (Némisol) était dilué dans

Fig. 1. — Courbe sigmoïde des pourcentages cumulés de succès (nombre de parasites tués) en fonction de la dose d'anthelminthique.

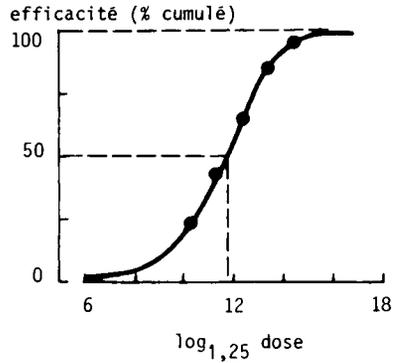


Fig. 2. — Histogramme de répartition des parasites sensibles à l'accroissement de la dose d'anthelminthique.

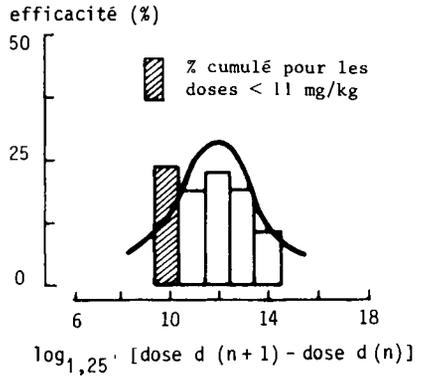
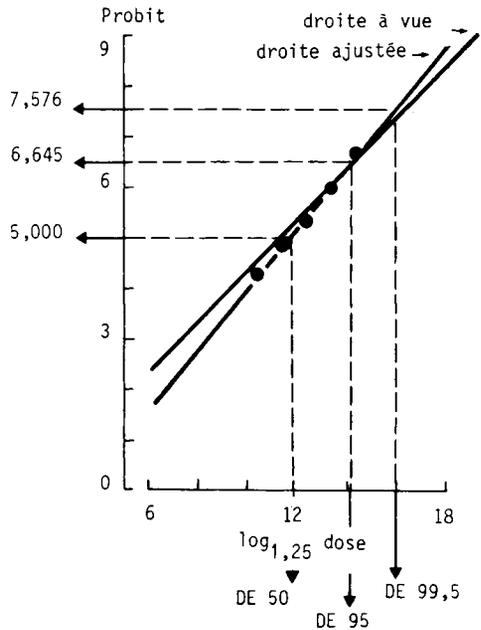


Fig. 3. — Droites dose-effet d'efficacité du thiabendazole sur la population de parasites adultes de *N. brasiliensis*. Détermination de la DE 50, de la DE 95 et de la DE 99,5. Droite tracée à vue et droite ajustée au maximum de vraisemblance.



du sérum physiologique et les ivermectines, dans du propylène glycol (Billaut, Aubervilliers).

L'administration par voie orale était réalisée par intubation forcée des animaux à l'aide d'une « canule à gaver » (longueur 200 mm, diamètre 2 mm) (Carrieri, Paris) : le lévamisole (Anthelsol) et le thiabendazole étaient dilués dans l'eau.

2.3. Critères d'efficacité des produits

L'efficacité d'un produit est exprimée en pourcentage de parasites tués. La différence entre le nombre moyen de parasites dénombrés à l'autopsie dans le groupe témoin (N0) et le nombre moyen de parasites dénombrés dans le groupe expérimental (N1) soumis au traitement représente le nombre de parasites tués au cours du traitement ; l'efficacité d'un produit sera donc donnée par la relation :

$$[(N0 - N1)/N0] \times 100$$

2.4. Numération des parasites

Nippostrongylus brasiliensis est un ver rond de la classe des Nématodes, dont les formes adultes se localisent dans le duodenum du rat.

Chaque rat reçoit par voie sous-cutanée 1 ml d'une suspension de 3 000 larves L₃ (Luffau, 1969). Les parasites adultes sont recueillis après autopsie des rats et ouverture de l'intestin grêle que l'on place dans un nouet de gaze et que l'on immerge dans un bain-marie de sérum physiologique. La numération s'effectue sur une partie aliquote de la suspension de vers (Luffau, 1969).

Tous les animaux traités ou témoins sont autopsiés neuf jours après infestation. Cependant, des autopsies ont été pratiquées six, huit et dix jours après infestation parmi les témoins ; celles-ci ont permis d'établir une cinétique de la population de parasites en dehors de toute intervention expérimentale et auraient permis de détecter toute anomalie éventuelle dans l'expérimentation.

La détermination du nombre d'œufs par gramme de fèces (epg) se fait selon la méthode classique de Mac Master (Whitlock, 1948). Ce nombre est établi sur un prélèvement effectué sur les crottes émises pendant un nyctémère par les rats d'un groupe expérimental (soit une cage). Les fèces ont été prélevés du cinquième au neuvième jour après infestation.

Résultats

Mesure de l'efficacité d'un produit : détermination de la DE 50 du thiabendazole

L'activité du thiabendazole se manifeste aussi bien sur le nombre de vers adultes (autopsie,

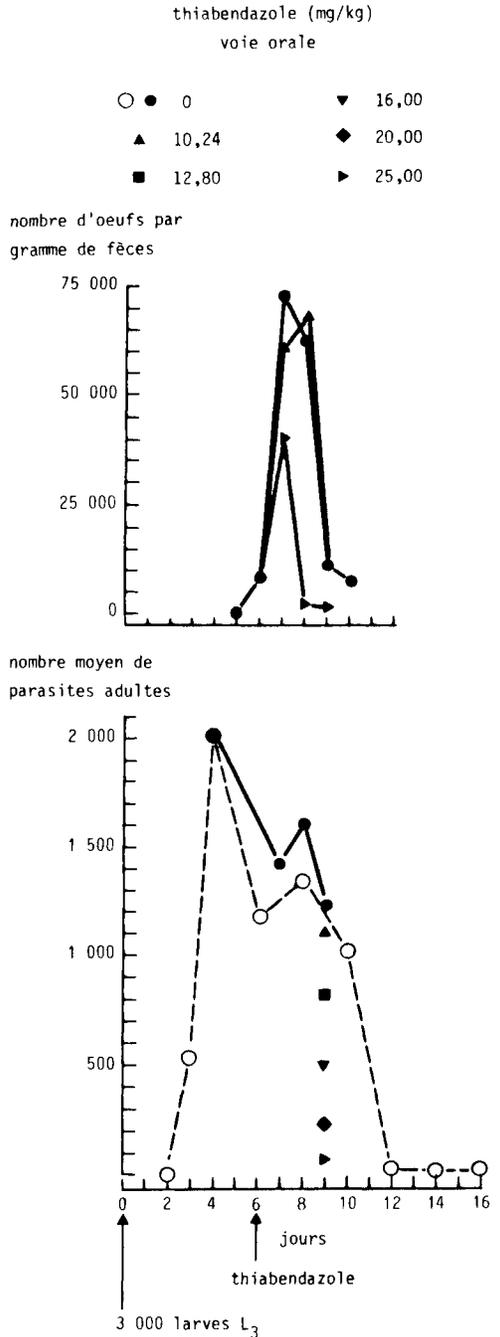


Fig. 4. — Evolution de la population de parasites adultes de *N. brasiliensis* dans l'intestin du rat et élimination des œufs après traitement par le thiabendazole.

neuf jours après l'infestation) que sur le nombre d'œufs par gramme de fèces (fig. 3 ; tabl. 1). Son efficacité croît avec la dose : de 25 % avec 10,24 mg/kg à 95 % avec 25 mg/kg (tabl. 1) que l'on exprime par l'histogramme du pourcentage de vers sensibles à la dose seuil (fig. 2) puis par la courbe des pourcentages cumulés de vers tués (fig. 1) c'est-à-dire sensibles à la dose seuil. La droite dose-effet (fig. 3) a été tracée, après transformation en unités probits de cette dernière courbe.

Le test de déviation par rapport à la droite (χ^2) est non-significatif ; l'ajustement de la droite la efficaces DE 50, DE 95 et DE 99,5 estimées sur le graphique sont alors respectivement : 13,6, 24,3 et 35,5 mg/kg (fig. 2).

Efficacité d'un produit

selon la voie d'administration :

comparaison des DE 50 du lévamisole

Que le lévamisole soit administré par voie sous-cutanée ou par voie orale, la totalité des parasites adultes est éliminée au-delà des doses de 15 mg/kg (tabl. 2). A partir des courbes probit-log, les doses efficaces DE 50, DE 95 et DE 99,5 sont respectivement par voie sous-cutanée : 3,7, 8,7 et 15,0, et par voie orale : 2,7, 8,7 et 15,4 (fig. 5). Quelle que soit la voie d'administration, l'efficacité du lévamisole est la même.

Efficacité d'un produit

selon le stade évolutif du parasite :

comparaison des DE 50 du thiabendazole

L'administration du thiabendazole deux jours après l'infestation permet de mesurer son effica-

cité contre les stades larvaires et, six jours après, son efficacité contre les parasites adultes, le thiabendazole étant actif à la fois sur les stades larvaires et sur les formes adultes de *N. brasiliensis* (tabl. 3).

Les doses efficaces DE 50, DE 95 et DE 99,5 sont respectivement : 12,6, 27,8 et 44,4 mg/kg sur les stades larvaires et 16,8, 35,5 et 56,7 mg/kg sur les formes adultes (fig. 6).

Comparaison de l'efficacité de deux produits : le thiabendazole et l'ivermectine

Les DE 99,5, DE 95 et DE 50 ont donc été calculées d'après les pourcentages du nombre de parasites tués (tabl. 4) (calculs effectués d'après le nombre de parasites dénombrés à l'autopsie au neuvième jour après l'infestation). Elles sont respectivement pour le thiabendazole : 78,2, 36,9 et 11,4 mg/kg ; pour l'ivermectine : 0,77, 0,26 et 0,04 mg/kg (fig. 7).

La distance horizontale des deux droites mesure le logarithme du coefficient de dilution de l'ivermectine pour obtenir le même effet que le thiabendazole. Par exemple, une dose de $\log_{1,5} = -0,5$ d'ivermectine produit le même effet que $\log_{1,5} = 10,5$ de thiabendazole, soit 99,5 % de parasites tués pour une quantité 100 fois moindre.

Discussion

Lorsqu'on soumet des animaux à des traitements anthelminthiques, seule une partie de la population des parasites qu'ils hébergent, sensible au médicament à la dose utilisée, est tuée et expulsée selon une loi de « tout ou rien ». Pour

Tableau 1. - Détermination de l'efficacité du thiabendazole administré par voie orale

| Thiabendazole 6 jours après infestation ^a | | Nombre moyen de parasites adultes ^b (9 jours après infestation) ^a | | Efficacité ^d (%) | Probit |
|---|----------------------|--|-------------------|--------------------------------|--------|
| dose mg/kg | $\log_{1,25}$ (dose) | dénombrés | tués ^c | | |
| 0 | ... | 1 450 | 0 | 0 | ... |
| 10,24 | 10,425 | 1 100 | 350 | 24,1 | 4,29 |
| 12,80 | 11,425 | 823 | 627 | 43,2 | 4,83 |
| 16,00 | 12,425 | 501 | 949 | 65,4 | 5,39 |
| 20,00 | 13,425 | 218 | 1 232 | 85,0 | 6,03 |
| 25,00 | 14,425 | 67 | 1 383 | 95,3 | 6,68 |

a : 3 000 larves L₃ de *N. brasiliensis* par animal par voie sous-cutanée.

b : 8 rats par dose et 18 rats non traités : femelles de 202 ± 2 g.

c : différence entre le nombre moyen de parasites dans les groupes traités et le groupe témoin (N₀ - N).

d : (nombre de parasites tués/nombre de parasites à l'autopsie dans le groupe témoin) × 100 : [(N₀ - N₁)/N₀] × 100.

Tableau 2. - Influence de la voie d'administration sur l'efficacité du levamisole

| Traitement 6 jours après infestation ^a | | Nombre moyen de parasites adultes ^b (9 jours après infestation) ^a | | Efficacité ^d (%) | Probit |
|--|-------------------------|--|-------------------|--------------------------------|--------|
| dose mg/kg | log ₂ (dose) | dénombrés | tués ^c | | |
| <i>Témoins</i> | | | | | |
| 0 | ... | 1 634 | 0 | 0 | ... |
| <i>Voie sous-cutanée</i> | | | | | |
| 1,875 | 0,906 | 1 376 | 289 | 17,7 | 4,085 |
| 3,750 | 1,906 | 1 080 | 554 | 33,9 | 4,587 |
| 7,500 | 2,906 | 96 | 1 539 | 94,1 | 6,535 |
| 15,000 | 3,906 | <1 | 1 634 | 99,9 | 7,576 |
| 30,000 | 4,906 | <1 | 1 634 | 99,9 | 7,576 |
| <i>Voie orale</i> | | | | | |
| 1,875 | 0,906 | 1 078 | 556 | 34,0 | 4,587 |
| 3,750 | 1,906 | 805 | 839 | 50,7 | 5,025 |
| 7,500 | 2,906 | 97 | 1 538 | 94,0 | 6,555 |
| 15,000 | 3,906 | 2 | 1 633 | 99,9 | 7,576 |
| 30,000 | 4,906 | 0 | 1 635 | 100 | ... |

a : 3 000 larves L₃ de *N. brasiliensis* par voie sous-cutanée et par animal.

b : 8 rats par dose et 34 rats non traités : mâles de 214 ± 36 g.

c : différence entre le nombre moyen de parasites à l'autopsie des groupes traités et du groupe témoin.

d : (nombre de parasites tués / nombre de parasites à l'autopsie dans le groupe témoin) × 100.

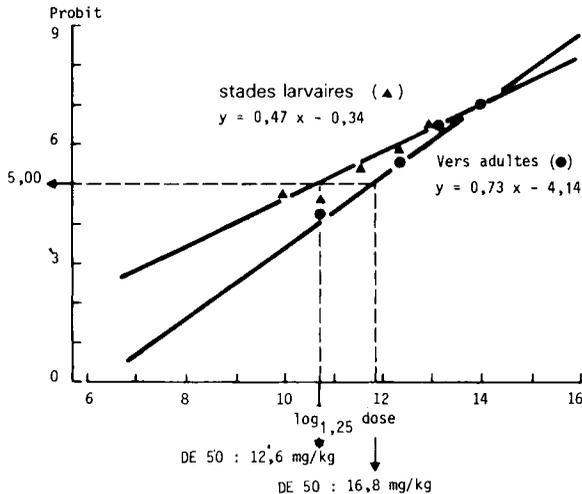


Fig. 5. — Droites dose-effet représentant les pourcentages (échelle probit) d'efficacité du lévamisole sur des populations de parasites adultes de *N. brasiliensis*. Détermination des DE 50.

némisol : administration par voie sous-cutanée.

anthesol : administration par voie buccale.

Tableau 3. - Efficacité du thiabendazole selon le stade évolutif du parasite

| Thiabendazole voie orale | | Nombre moyen de parasites adultes ^a 9 jours après infestation ^b | | Efficacité ^d (%) | Probit |
|---|----------------------------|--|-------------------|--------------------------------|--------|
| dose (mg/kg) | log _{1,25} (dose) | dénombrés | tués ^c | | |
| <i>Témoins</i> | | | | | |
| 0 | ... | 1 143 | 0 | 0 | ... |
| <i>Traitement 2 jours après infestation</i> | | | | | |
| 10,24 | 10,425 | 670 | 431 | 39,1 | 4,73 |
| 12,80 | 11,425 | 728 | 373 | 38,2 | 4,58 |
| 16,00 | 12,425 | 280 | 821 | 74,6 | 5,66 |
| 20,00 | 13,425 | 152 | 949 | 86,2 | 6,09 |
| 25,00 | 14,425 | 77 | 1 024 | 93,0 | 6,48 |
| <i>Traitement 6 jours après infestation</i> | | | | | |
| 10,24 | 10,425 | 1 334 | 0 | 0 | ... |
| 12,80 | 11,425 | 836 | 264 | 24,0 | 4,29 |
| 16,00 | 12,425 | 17 | 1 084 | 98,5 | 7,17 |
| 20,00 | 13,425 | 325 | 776 | 70,5 | 5,53 |
| 25,00 | 14,425 | 74 | 1 027 | 93,3 | 6,49 |

a : 8 rats par dose et 18 rats témoins ; mâles de 314 ± 4 g.

b : 3 000 larves L₃ de *N. brasiliensis* par voie sous-cutanée et par animal.

c : différence entre le nombre moyen de parasites à l'autopsie des groupes traités et du groupe témoin.

d : (nombre de parasites tués / nombre de parasites à l'autopsie dans le groupe témoin) \times 100.

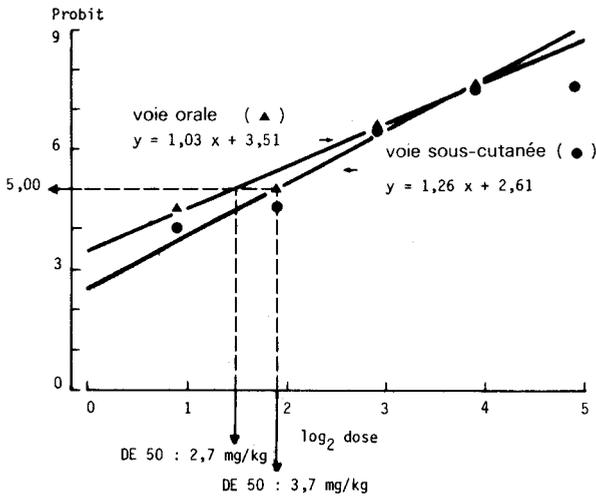


Fig. 6. — Droites dose-effet représentant les pourcentages (échelle probit) d'efficacité du thiabendazole sur les populations de parasites adultes et les stades larvaires. Détermination de la DE 50.

Tableau 4. - Comparaison de l'efficacité de deux substances le thiabendazole et l'ivermectine

| Traitement 6 jours après infestation ^a | | Nombre moyen de parasites adultes ^b 9 jours après infestation ^a | | Efficacité ^d (%) | Probit |
|--|---------------------------|--|-------------------|--------------------------------|--------|
| dose (mg/kg) | log _{1,5} (dose) | dénombrés | tués ^c | | |
| <i>Témoins</i> | | | | | |
| 0 | ... | 1 641 | 0 | 0 | ... |
| <i>Thiabendazole, voie orale</i> | | | | | |
| 7,41 | 4,936 | 1 266 | 339 | 21,1 | 4,198 |
| 11,11 | 5,936 | 752 | 852 | 53,0 | 5,075 |
| 16,65 | 6,936 | 428 | 1 177 | 73,3 | 5,619 |
| 25,00 | 7,936 | 390 | 1 215 | 75,7 | 5,696 |
| 37,46 | 8,936 | 11 | 1 594 | 99,3 | 7,481 |
| <i>Ivermectine, voie sous-cutanée</i> | | | | | |
| 0,020 | - 9,534 | 1 154 | 451 | 28,10 | 4,420 |
| 0,031 | - 8,534 | 1 044 | 561 | 34,95 | 4,613 |
| 0,047 | - 7,534 | 624 | 981 | 61,12 | 5,282 |
| 0,070 | - 6,534 | 456 | 1 149 | 71,59 | 5,570 |
| 0,106 | - 5,534 | 349 | 1 256 | 78,26 | 5,780 |

a : 3 000 larves L₃ de *N. brasiliensis* par voie sous-cutanée et par animal.

b : 8 rats par dose et 8 rats témoins, mâles d'un poids de 357 ± 5 g.

c : différence entre le nombre moyen de parasites à l'autopsie des groupes traités et du groupe témoin.

d : (nombre de parasites tués / nombre de parasites à l'autopsie dans le groupe témoin) × 100.

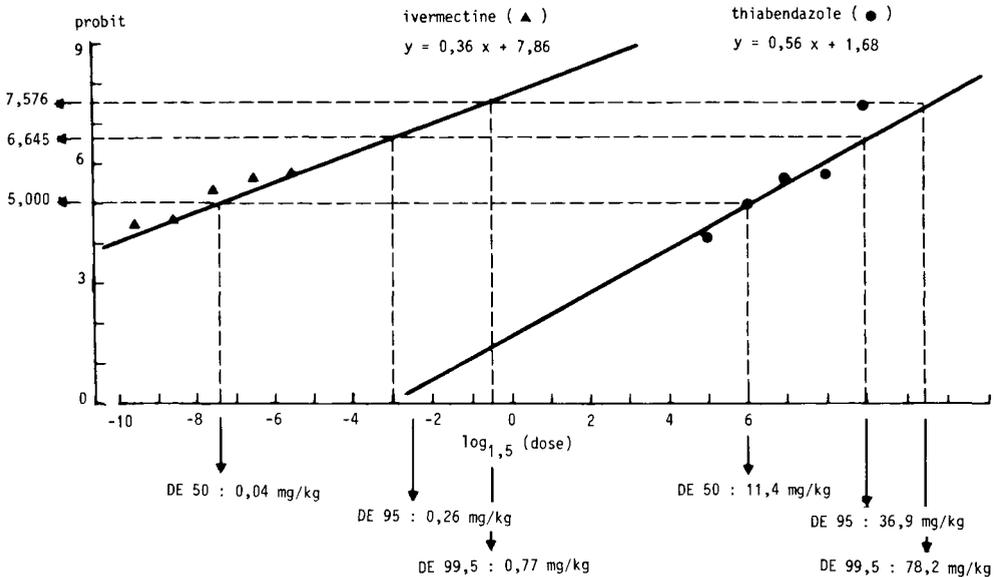


Fig. 7. — Droites dose-effet représentant les pourcentages (échelle probit) d'efficacité de thiabendazole et de l'ivermectine sur des populations de parasites adultes de *N. brasiliensis*. Détermination de la DE 50.

chacune des doses de médicaments, cette fraction de la population peut être exprimée par un pourcentage. Moyennant deux changements d'échelle (logarithme pour les doses portées en abscisses, probit pour les pourcentages portés en ordonnées) nos expériences montrent qu'il existe une relation linéaire entre les probits des pourcentages des parasites éliminés et les logarithmes des doses (droite de Henry); le phénomène obéit à une loi normale. Dès lors, il est aisé de calculer la DE 50 d'un anthelminthique et d'estimer des doses limites (DE 95, DE 99,5) qui intéressent le thérapeute. C'est ce qui a été fait pour trois médicaments dont l'efficacité est réelle et n'a plus à être démontrée à l'heure actuelle : ivermectine, lévamisole, thiabendazole, en soumettant à leur activité un parasite du rat *Nippostrongylus brasiliensis*.

La DE 50 peut être calculée avec précision, en effet la droite qui permet de l'obtenir est le résultat d'ajustements au maximum de vraisemblance par une série d'itérations : c'est donc la droite la plus juste au regard des résultats expérimentaux. De plus, le probit 5 (50 % de parasites tués) grâce auquel on détermine la DE 50 correspond au point d'inflexion de la courbe sigmoïde des fréquences cumulées qui sert à tracer la droite de Henry ; dans cette zone, la courbe peut être assimilée à une droite. L'expérience nous a montré que, pour un médicament agissant sur un parasite donné, la DE 50 est une valeur constante (p.e. pour le thiabendazole utilisé contre *N. brasiliensis*, la DE 50 est voisine de 15 mg).

La détermination des doses limites (DE 100) est beaucoup plus aléatoire et imprécise ; en effet, dans cette zone l'activité du médicament varie peu en fonction de la dose. La courbe sigmoïde des pourcentages cumulés devient asymptote à la droite passant par l'ordonnée 100 %, parallèle à l'abscisse ; c'est une zone où la courbe dose-effet est mal connue. C'est la raison pour laquelle nous ne donnons pas la valeur de la DE 100, dose de produit à partir de laquelle toute la population de parasites est tuée ; ce serait une valeur théorique et fallacieuse. Nous préférons donner les valeurs de la DE 95 et de la DE 99,5. Ces valeurs donnent des renseignements précieux aux thérapeutes, mais sont moins entachées de l'incertitude liée à l'estimation de la DE 100.

Nous affichons donc trois valeurs qui caractérisent l'activité anthelminthique d'un médicament : DE 50, DE 95 et DE 99,5.

Ces valeurs intrinsèques peuvent se révéler insuffisantes à caractériser l'efficacité anthelmin-

thique d'une substance parce qu'il existe une variabilité inhérente à l'expérimentation biologique malgré les précautions prises (standardisation des conditions expérimentales, répartition au hasard des animaux, etc.). On est alors amené à définir l'efficacité d'un médicament anthelminthique en comparant son efficacité à celle d'un anthelminthique connu, pris comme standard de référence ; en d'autres termes, on effectue une évaluation relative de la valeur anthelminthique de la substance. Tout se passe comme si nous admettions que la substance à tester se comportait comme une dilution de la substance de référence, ce qui est possible lorsque les deux droites probit = $f(\log d)$ sont deux droites parallèles. Pour un même pourcentage d'efficacité p , la première substance devra être administrée à la dose d_1 , la deuxième à la dose d_2 ; la différence des logarithmes des deux doses mesure le facteur de dilution (donc le rapport d'efficacité).

Ce type d'étude comparative peut être très intéressant lorsqu'on veut comparer l'activité de deux molécules dont les modes d'action sont semblables ou bien lorsqu'on veut comparer l'activité d'une même molécule selon sa présentation pharmaceutique (granulométrie des phénothiazines), selon sa conformation stérique (L ou D tétramisole), selon les sels utilisés (sels de pipérazine) ou selon qu'elle est utilisée contre les formes larvaires, contre les formes adultes ou contre des souches de parasites résistantes aux anthelminthiques.

Les deux droites peuvent ne pas être parallèles (thiabendazole et ivermectine) ; le mode d'action de ces produits ne procède pas du même mécanisme ; seules peuvent être calculées et comparées les deux DE 50 : le rapport d'efficacité n'est pas le même à basse et à haute dose.

De nombreux auteurs se sont intéressés à la manière de tester l'efficacité des médicaments anthelminthiques, soit qu'ils aient utilisé des animaux de laboratoire porteurs de leurs propres parasites (Baker, 1963), soit qu'ils aient utilisé des animaux domestiques infestés naturellement ou artificiellement. Différentes méthodologies et différentes expressions des résultats ont été utilisées : pourcentages de parasites éliminés dans les fèces par rapport au nombre de parasites non éliminés déterminé après autopsie ou « critical test », pourcentages de parasites tués chez les traités par rapport à une population chez les non-traités ou « controlled test ». Nous avons procédé comme pour le « controlled test » : administration de doses croissantes d'anthelminthiques à des groupes de rats parasités, calcul du

pourcentage de parasites tués. Des critiques ont été formulées (Egerton *et al.*, 1963 ; Reinecke, 1980) quant à la validité dans l'interprétation statistique des résultats et les transformations probit effectuées ; en effet, la transformation probit repose sur l'hypothèse de normalité de distribution des doses-seuils. Nous avons supposé, et vérifié, que dans la population de vers soumise au traitement anthelminthique (les rats ne sont considérés que comme les contenants de cette population), il existe des sujets (des vers) sensibles à une dose juste suffisante (seuil) pour qu'ils soient tués et éliminés. On admet, en statistique « qu'il y a identification complète entre la fonction de répartition (cumulation) des seuils et la courbe dose-effet d'une réaction en « tout-ou-rien » (Lazar, 1974).

D'un point de vue pratique, cette méthode peut être utilisée au tri des molécules supposées posséder une activité anthelminthique « screening » et à une première appréciation de leur activité (calcul de la DE 50). La méthode, telle que nous l'avons exposée, peut être allégée : trois doses d'anthelminthique suffisent à tracer la droite dose-effet ; elles doivent se situer autour de la dose qui tue 50 % des parasites, et être, les unes par rapport aux autres, dans un rapport de dilution assez grand. Dans ce cas, 24 rats (3 groupes de 8), sans compter les témoins, suffiraient à estimer l'efficacité d'un médicament.

Du point de vue du pharmacologue, la DE 50 est une valeur qui caractérise sans ambiguïté l'activité anthelminthique d'une molécule ; pour un parasite donné, c'est un paramètre stable. La

méthode de détermination (probit) se prête à des comparaisons d'efficacité si l'on convient de se référer à un médicament standard.

Du point de vue du thérapeute, l'étude de la loi dose-effet, et le calcul de la DE permettent de tirer des conclusions quant à la voie d'administration ou à la présentation du produit. La dose thérapeutique (efficacité maximale pour une quantité minimale de produit) est plus difficile à apprécier : elle doit tenir compte, en effet, de l'effet toxique, des répercussions physiopathologiques du médicament. La méthode donne cependant avec une bonne approximation la DE 99,5.

En conclusion, pour que la méthode ait une portée tout à fait générale il est nécessaire d'établir une corrélation entre les résultats obtenus avec des parasites d'animaux de laboratoire et ceux obtenus avec les parasites des animaux domestiques. Le calcul de la DE 50 d'un médicament anthelminthique peut être effectué avec précision sur les modèles expérimentaux de laboratoire et être transposé à moindres frais sur le terrain.

Accepté pour publication, le 25 août 1982.

Remerciements

M. Lhortolary a apporté son aide technique au cours de cette expérimentation. Mademoiselle Nézondé a assuré la partie graphique de la publication. Nous les en remercions bien vivement.

Résumé

Des expériences de vermifugation qui mettaient en œuvre l'ivermectine, le thiabendazole, et le lévamisole ont été effectuées chez des rats infestés par *Nippostrongylus brasiliensis*. Elles avaient pour but de montrer la possibilité, puis l'intérêt de définir la dose efficace à 50 % (DE 50) et éventuellement de prévoir la DE 99,5 d'un médicament anthelminthique. A côté de cette mesure absolue, la loi dose-effet permet de procéder à une évaluation relative de l'efficacité d'un anthelminthique par comparaison avec un anthelminthique de référence (deux exemples en sont donnés). Ces résultats furent obtenus aux conditions suivantes : homogénéité des lots de rats (âge, poids, sexe), infestation identique de tous les animaux (3 000 larves au jour 0), vermifugation au sixième jour, autopsie au neuvième jour. L'appréciation de l'activité anthelminthique du médicament est basée essentiellement sur la mortalité dans la population de vers adultes. Une transformation mathématique des valeurs est effectuée sur les doses (logarithmes) et sur les pourcentages de vers tués (probits) ; la courbe dose-effet est une droite à partir de laquelle on déduit la valeur de la DE 50. La répartition normale dans la population des vers, des vers sensibles à une dose a été vérifiée ce qui rend légitimes les interprétations statistiques.

Références

- AUBERT M.F.A., 1980. Méthodes simples d'interprétation statistique des essais biologiques à réponses individuelles du type « tout-ou-rien ». *Bull. ENSAIA Nancy*, **22**, 51-60.
- BAKER N.F., 1963. The evaluation of anthelmintics for nematodes using *in vivo* test in small laboratory animals. In : E.J.L. Soulsby (ed.) *The evaluation of anthelmintics. Proc. 1st Int. Conf. World Ass. Adv. Vet. Parasitol.*, Hannover, 1963, 18-26, Merck, Sharp and Dohme, New-York.
- BLANCOU J., FEDIDA M., AUBERT M.F.A., 1980. Evaluation expérimentale *in vivo* de l'activité des produits biologiques à usage vétérinaire. Technique, valeur, limites. *Bull. Soc. Sci. Vét. Méd. Comp. Lyon*, **82**, 165-172.
- EGERTON J.R., OTT W.H., CUCKLER A.C., 1963. Methods for evaluating anthelmintics in the laboratory and their application to field conditions. In : E.J.L. Soulsby (ed.) *The evaluation of anthelmintics. Proc. 1st Int. Conf. World Ass. Adv. Vet. Parasitol.*, Hannover, 1963, Merck, Sharp and Dohme, New-York.
- FINNEY D.J., 1971. *Probit analysis*. 3rd ed., 1971. Cambridge University Press, Cambridge, 333 pp.
- FINNEY D.J., 1978. *Statistical method in biological assay*. 3rd ed. C. Griffin and Co. Ltd. London, 370-403.
- GRAB B., 1982. Probit analysis of log dose/response test from 3-6 points assays. *Organisation Mondiale de la Santé*. WHO/MAL/82976.
- GROS G., TACHON P., 1971. La DL 50 : quelques généralités et deux méthodes voisines de calcul. *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, **14**, 573-579.
- GIBSON T.E., 1963. The use of the critical and the controlled test for the evaluation of anthelmintics against gastrointestinal worms. In : E.J.L. Soulsby (ed.) *The evaluation of anthelmintics. Proc. 1st Int. Conf. World Ass. Adv. Vet. Parasitol.*, Hannover, 1963, 55-60, Merck, Sharp and Dohme, New-York.
- HALL M.C., FOSTER W.D., 1918. Efficacy of some anthelmintics. *J. Agric. Res.*, **12**, 397-447.
- LELLOUCH J., LAZAR P., 1974. *Méthodes statistiques en expérimentation biologique*. Flammarion Médecine Sciences, Paris, 279 pp.
- LUFFAU G., 1969. *Nippostrongylus brasiliensis*, modèle expérimental pour l'étude de l'autostérilisation des némathelminthoses du tractus digestif. I. Cycle du parasite. *Rech. Vét.*, **3**, 59-73.
- MOSKEY H.E., HARWOOD P.D., 1941. Methods of evaluating the efficacy of anthelmintics. *Am. J. Vet. Res.*, **2**, 55-59.
- REINECKE R.K., 1980. Chemotherapy in the control of helminthosis. *Vet. Parasitol.*, **6**, 255-292.
- SCHWARTZ D., 1963. *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. Editions Médicales Flammarion, Paris, 290 pp.
- SCHWARTZ D., FLAMANT R., LELLOUCH J., 1970. *L'essai thérapeutique chez l'homme*. Editions Médicales Flammarion, Paris, 279 pp.
- STELLMANN C., TERRE J., 1965. Choix d'une méthode de calculs statistiques en vue de contrôles d'activité des produits biologiques sur animaux. *Bull. Soc. Sci. Vét. Méd. Comp. Lyon*, **67**, 272-282.
- VALLERON A.J., LAZAR P., 1966. *Exercices programmés de statistique à l'usage des médecins et biologistes*. Editions Médicales Flammarion, Paris, 248 pp.
- WHITLOCK H.V., 1948. Some modifications of the MacMaster helminth egg counting technique and apparatus. *J. Counc. Indus. Res.*, **21**, 177-180.