AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

NANCY UNIVERSITE, Université Henry Poincaré
ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT"

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Discipline : ARN : Biogenèse et Structure / Fonction

Présentée et soutenue publiquement

par

Hélène JEULIN

le 17 Décembre 2008

Titre

IMPACT VIROLOGIQUE ET PHARMACOLOGIQUE DE LA COMPLEXATION DE LA RIBAVIRINE AUX CYCLODEXTRINES SUR UN MODELE ANIMAL D'ENCEPHALITE ROUGEOLEUSE

DIRECTEURS DE THESE :

Madame le Docteur Francine KEDZIEREWICZ
Madame le Docteur Véronique VENARD

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur Henri AGUT (rapporteur)
Madame le Professeur Barbara GARTNER (rapporteur)

Madame le Docteur Francine KEDZIEREWICZ
Monsieur le Professeur Bruno LINA
Monsieur le Professeur Pierre MUTZENHARDT
Madame le Docteur Véronique VENARD

An Frau Professor Doctor Barbara Gärtner,

Sie haben angenomen diese These zu urteilen. Finden hier den Ausdruck unserer respektvollen dankarbeit.

A Monsieur le Professeur Henri Agut,

Vous avez accepté de juger cette thèse, nous vous prions de trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Bruno Lina,

Pour l'honneur que vous nous faites de participer à ce jury, veuillez accepter nos remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Professeur Pierre Mutzenhardt,

Nous sommes très honorés de votre présence dans ce jury et nous vous sommes très reconnaissants de nous donner votre avis sur ce travail.

A Madame le Docteur Francine Kedzierewicz,

Vous avez accepté de diriger ce travail, nous vous remercions pour l'accueil que vous nous avez réservé ainsi que pour la confiance que vous nous avez portée en toutes circonstances. Votre compétence, vos conseils et votre bienveillance à notre égard nous ont été d'une grande aide. Puisse cette thèse être la marque de notre reconnaissance.

A Madame le Docteur Véronique Venard,

Vous nous avez encadré dès le DEA. Vos grandes qualités humaines, votre disponibilité, votre goût de la rigueur et de la perfection ainsi que votre persévérance nous ont permis de mener à bien ce travail. Nous vous remercions pour votre soutien et vos conseils avisés tout au long de notre thèse. Veuillez considérer ce travail comme le témoignage de notre gratitude.

A Monsieur le Professeur Alain Le Faou pour nous avoir recrutés au sein de votre équipe de recherche et de votre équipe hospitalière.

A Madame le Professeur Chantal Finance et Monsieur le Professeur Alain Lozniewski pour nous avoir accueillis dans vos laboratoires respectifs.

A la mémoire de Monsieur le Professeur Bernard Fortier, pour nous avoir fait confiance et nous avoir permis de finir notre thèse en tant qu'Assistante Hospitalo - Universitaire.

A Monsieur le Professeur Claude Muller, merci pour nous avoir suivis tout au long de ce travail et pour l'aide technique que nous avons pu trouver au sein du Laboratoire National de Santé du Luxembourg.

A toute l'équipe dirigeante de l'Unité Mixte de Recherche 7565 et plus particulièrement du Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament.

Un merci tout particulier à ceux qui m'ont entourée au cours de ce travail, Hermine, Rania, Saoussan et Emmanuel qui étaient présents à mes débuts, Eric et Catherine du GEVSM, aux autres chercheurs : Florence (MCU), Raphaël (MCU), Catherine, Chloé, Maxime, Hugues, et particulièrement à Nicolas Grancher dont j'ai poursuivi le travail.

A Eliane pour sa précieuse aide technique et pour les bons moments.

A Stéphane, pour son soutien et son aide technique.

A toutes les techniciennes, aux cadres de santé, aux secrétaires et à M. Mayer, animalier, du Laboratoire de Virologie du CHU de Nancy Brabois.

Je dédie ce travail à mes parents, merci pour tout ce que vous m'apportez.

A mes grands parents,

A Benoit, Agnès et Guillaume,

A Corentine et Marie, votre amitié au sein du laboratoire m'est extrêmement précieuse,

A tous mes amis,

A Toi.

SOMMAIRE

INTRODUCTION **9**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **11**

I. Infections du systeme nerveux central **12**
I.1 Généralités 12
I.2 Epidémiologie des infections virales du système nerveux central 13
I.3 Syndromes infectieux du système nerveux central 15
I.3.1 Les méningites virales 15
I.3.2 Les encéphalites 15
I.3.3 Les autres atteintes neurologiques virales 16
I.4 Principaux virus et familles de virus responsables d'encéphalites 17
I.5 Physiopathologie 23
I.6 Modèles animaux 24
I.7 Diagnostic des infections virales neuro-méningées 26
I.7.1 Diagnostic direct 26
I.7.2 Diagnostic indirect 26

II. Le virus de la rougeole **28**
II.1 Classification 28
II.2 Historique 28
II.3 Epidémiologie et transmission 28
II.4 Structure 30
II.5 Réplication virale 32
II.5.1 Absorption et entrée du virus 33
II.5.2 Fusion 34
II.5.3 Transcription 35
II.5.4 Réplication 36
II.5.5 Assemblage du virion et relargage 36
II.6 Physiopathologie 37
II.6.1 Réplication *in vivo* 37
II.6.2 Rôle des protéines V et C 38
II.6.3 Persistance et neurovirulence 38
II.7 Clinique 40
II.7.1 Rougeole commune 40
II.7.2 Complications neurologiques 41
II.7.3 Autres complications 42
II.8 Traitements 44
II.8.1 Curatif 44
II.8.2 Préventif 45

III. Ribavirine **46**
III.1 Généralités 46
III.2 Cibles virales 48
III.3 Mécanisme d'action 51
III.3.1 Inhibition de l'inosine monophosphate déhydrogénase 51
III.3.2 Immunomodulation 52
III.3.3 Inhibition du "coiffage" des ARN 53
III.3.4 Inhibition de la polymérase 54
III.3.5 Induction de mutations létales dans le génome des virus à ARN 54

III.4 Pharmacologie de la ribavirine 56
III.4.1 Métabolisme et effets cellulaires de la ribavirine 56
III.4.2 Administration par voie orale 56
III.4.3 Administration par voie parentérale 57
III.5 Toxicité 57
III.5.1 Anémie hémolytique 57
III.5.2 Tératogénicité 58
III.5.3 Autres effets indésirables 58
III.6 Molécules dérivées de la ribavirine 58
III.6.1 La viramidine 58
III.6.2 Dérivés estérifiés 59
III.6.3 Ciblage hépatique 59
III.6.4 La lévovirine 60
III.7 Ribavirine et encéphalites 60

IV. Les Cyclodextrines 62
IV.1 Historique 62
IV.2 Généralités 62
IV.3 Production des cyclodextrines 63
IV.4 Propriétés 63
IV.5 Pharmacocinétique des cyclodextrines 65
IV.5.1 Administration parentérale 65
IV.5.2 Administration orale 66
IV.6 Toxicité des cyclodextrines 67
IV.6.1 Toxicité cellulaire 67
IV.6.2 Formes orales 67
IV.6.3 Formes parentérales 68
IV.7 Applications industrielles des cyclodextrines 68
IV.8 Utilisations pharmaceutiques des cyclodextrines 69
IV.8.1 Applications parentérales 69
IV.8.2 Applications entérales 71
IV.8.3 Applications ophtalmiques 71
IV.8.4 Applications intranasales 72
IV.8.5 Applications inhalées 72
IV.8.6 Applications dermiques 73
IV.8.7 Action anti-infectieuse propre 74
IV.8.8 Formes commercialisées 75
IV.9 Cyclodextrines et ribavirine 78

V. La Barrière hémato-encéphalique 80
V.1 Biologie de la barrière hémato-encéphalique 80
V.1.1 Anatomie 80
V.1.2 Vascularisation et cellules endothéliales 80
V.1.3 Astrocytes et péricytes 81
V.2 Passage de la barrière hémato-encéphalique 82
V.2.1 Systèmes de transport 82
V.2.2 Transport de molécules exogènes 84
V.2.3 Augmentation de la délivrance 85
V.3 Exploration de la barrière hémato-encéphalique 87
V.3.1 Limites des modèles *in vitro* 87
V.3.2 Méthodes fondées sur les animaux 87
V.4 Pathologies de la barrière hémato-encéphalique 90
V.4.1 Modification des jonctions serrées 90
V.4.2 Altération des systèmes de transport 91
V.4.3 Migration des leucocytes 92
V.5 Barrière hémato-encéphalique et ribavirine 92
V.6 Barrière hémato-encéphalique et cyclodextrines 92

MATERIEL ET METHODES 94

VI. Matériel 95
VI.1 Matériel utilisé pour les études d'activité antivirale *in vivo* 95
VI.1.1 Réactifs et consommables 95
VI.1.2 Souris 96
VI.1.3 Souches de virus 96
VI.1.4 Appareillages de biologie moléculaire 97
VI.2 Matériel utilisé pour les études pharmacocinétiques 97
VI.2.1 Réactifs et consommables 97
VI.2.2 Appareillages 98

VII. Méthodes 99
VII.1 Etude *in vivo* de l'activité antivirale des complexes 99
VII.1.1 Préparation des complexes 99
VII.1.2 Entretien des animaux 99
VII.1.3 Inoculation 99
VII.1.4 Traitement 100
VII.1.5 Détermination de la dose létale 50 de la ribavirine, de l'alpha- et la bêta-cyclodextrine et des complexes ribavirine/alpha-cyclodextrine et ribavirine/bêta-cyclodextrine 100
VII.1.6 Détermination de la charge virale 100
VII.1.7 Protocole d'évaluation de l'activité antivirale 102
VII.2 Etude pharmacocinétique du complexe 103
VII.2.1 Préparation de l'échantillon pour l'extraction en phase solide 103
VII.2.2 Extraction en phase solide 103
VII.2.3 Chromatographie liquide haute performance 105
VII.2.4 Réalisation d'une gamme de quantification *ex vivo* 106
VII.2.5 Détermination de la pharmacocinétique de la ribavirine dans le cerveau 106

RESULTATS ET DISCUSSION 108

VIII. Activité antivirale *in vivo* 109
VIII.1 Démarche expérimentale 109
VIII.2 Problèmes rencontrés 109
VIII.3 Résumé de l'article 110
VIII.3.1 Complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine 110
VIII.3.2 Complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine 118

IX. Etude pharmacocinétique du complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine 124
IX.1 Démarche expérimentale 124
IX.2 Résumé de l'article 126

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 150

REFERENCES 153

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Taux de couverture vaccinale rougeole (doses 1 et 2), en 2004, pour les pays membres de la région européenne de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2004 (Copyright ©2006 BMJ Publishing Group Ltd., Asaria, P. et al. BMJ 2006; 333:890-895) 29
Figure 2. Schéma de la structure du virus de la rougeole et de son génome [Yanagi et al., 2006a] 31
Figure 3. Cycle de réplication du virus de la rougeole (d'après P. Lebon, Université René Descartes Paris 5) 32
Figure 4. Récepteurs SLAM et CD46 du virus de la rougeole [Yanagi et al., 2006a] 33
Figure 5. Physiopathologie de l'infection due au virus de la rougeole (d'après P. Lebon, Université René Descartes Paris 5) 37
Figure 6. Réponse immunitaire et immunodépression (d'après P. Lebon, Université René Descartes Paris 5) 44
Figure 7. Structure de la ribavirine [1-(β-D-ribofuranosyl)-1H-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide] 46
Figure 8. Inhibition de l'inosine monophosphate déhydrogénase par la ribavirine (d'après Graci et al., 2006) 52
Figure 9. Mécanisme du coiffage des ARN en 5' (d'après Graci et al., 2006) 53
Figure 10. Mésappariement de la ribavirine avec les bases puriques, à l'origine des phénomènes de mutagenèse létale (d'après Graci et al., 2006) 55
Figure 11. Mécanisme de libération de la ribavirine à partir d'une prodrogue, la viramidine (d'après Wu et al., 2004) 59
Figure 12. Structure des cyclodextrines natives, alpha, bêta et gamma 62
Figure 13. Amélioration *in vivo* de la pousse des cheveux par le minoxidil dans une solution de triamino alpha-cyclodextrine 74
Figure 14. Dérivés de la bêta-cyclodextrine testés pour bloquer la toxine létale de *Bacillus anthracis* 75
Figure 15. Structure de la barrière hémato-encéphalique [Blasi et al., 2007] 82
Figure 16. Différentes voies de transport à travers la BHE [Pardridge, 2007] 83
Figure 17. Montage des appareillages et verreries lors de l'extraction en phase solide 98
Figure 18. Extraction de la ribavirine à partir de broyat de cerveaux : fixation sur la cartouche et élution des composés indésirables 104
Figure 19. Extraction de la ribavirine à partir de broyats de cerveaux : élution de la ribavirine fixée sur la cartouche et lyophilisation de l'éluât 105
Figure 20. Interaction entre l'acide phényle boronique et un groupement diol [Mazzeo & Krull, 1989] 125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Prévalence des principaux virus responsables d'infections du système nerveux central 14
Tableau 2. Principales étiologies des infections virales du système nerveux central 18
Tableau 3. Formes commercialisées de ribavirine : renseignements généraux et galéniques (d'après http://www.Theriaque.org) 47
Tableau 4. Activité antivirale *in vitro* ou *in vivo* de la ribavirine sur les virus responsables d'infections du système nerveux central chez l'Homme 49
Tableau 5. Solubilités et monographies à la Pharmacopée des cyclodextrines entrant dans la composition de produits pharmaceutiques commercialisés [Loftsson & Duchene, 2007] 64
Tableau 6. Pharmacocinétique et toxicité des cyclodextrines natives d'après Del Valle (2004) 65
Tableau 7. Médicaments disposant d'une autorisation de mise sur le marché en France et contenant une cyclodextrine (d'après http://www.Theriaque.org) 76
Tableau 8. Marqueurs les plus couramment utilisés pour étudier la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique [Hawkins & Egleton, 2008] 88
Tableau 9. Séquences des amorces et des sondes utilisées dans les techniques de biologie moléculaire 96

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
BHE	Barrière hémato-encéphalique
C	Cytosine
CD	Cyclodextrine
CDV	Virus de la maladie de Carré (*Canine distemper virus*)
CI_{50}	Concentration inhibitrice 50
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CMLV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
CMV	Cytomégalovirus
Da	Dalton
DL_{50}	Dose létale 50
EBV	Virus d'Epstein Barr (*Epstein Barr virusI*)
G	Guanine
GAPDH	Glycéraldehyde-3-phosphate déhydrogenase
GMP	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
IMP	Inosine monophosphate
IMPDH	Inosine monophosphate dehydrogénase
HHV-6	Herpesvirus humain 6

HPRV	Virus à ARN hautement pathogène (*High pathogenic RNA virus*)
HSV	Herpes simplex virus
IL	Interleukine
IMP	Inosine monophosphate
IMPDH	Inosine monophosphate déshydrogénase
LCR	Liquide céphalorachidien
LEMP	Leucoencéphalopathie multifocale progressive
m	Méthyle
MDR	*Multi drug resistance*
MV	*Measles virus*
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Oto-rhino laryngé
P	Phosphate
PESS	Panencéphalite subaiguë sclérosante
R	Coefficient de régression
PBA	Acide phényl boronique (*Phenyl boronic acid*)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymearse chain reaction*)
P-gp	P-glycoprotéine
RBV	Ribavirine
RMP	Ribavirine 5'-monophosphate
ROR	Rougeole-Oreillons-Rubéole
RTP	Ribavirine 5'-triphosphate
RT-PCR	*Reverse transcription polymerase chain reaction*
SAP	SLAM-*associated protein*
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIV	Virus de l'immunodéficience simienne (*Simian immunodeficiency virus*)
SLAM	*Signaling lymphocyte-activation molecule*

SNC	Système nerveux central
TBE	Encéphalite à tique (*Tick-borne encephalitis*)
TNF	*Tumor necrosis factor*
U	Uracile
UFP	Unités formant plages
UV	Ultra-violet
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VR	Virus de la rougeole
VRS	Virus respiratoire syncytial
VZV	Virus du zona et de la varicelle
XMP	Xanthosine monophosphate

INTRODUCTION

Les infections du système nerveux central sont principalement dues aux virus. Outre les virus de la famille des *Herpesviridae*, les principaux virus responsables d'encéphalites sont des virus à ARN. Même si les encéphalites dues au virus de la rougeole ne représentent qu'un faible nombre de cas en France, elles sont responsables d'une part importante des décès secondaires aux infections rougeoleuses dans le monde. La ribavirine présente une activité antivirale *in vitro* contre de nombreux virus responsables d'infections du système nerveux central, dont la rougeole, mais son activité antivirale *in vivo* est limitée par une faible biodisponibilité.

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques produits par digestion enzymatique de l'amidon. Elles ont la capacité de former des complexes d'inclusion ou d'association avec une molécule hôte, comme cela a été précédemment démontré pour la ribavirine. Largement employées dans l'industrie pharmaceutique pour améliorer les propriétés physicochimiques et pharmacologiques de la molécule hôte au sein du complexe, les cyclodextrines peuvent notamment favoriser la diffusion de la molécule complexée à travers les barrières biologiques. Leur utilisation pour faciliter l'accès des agents thérapeutiques au système nerveux central est à ce jour peu étudiée, alors que la présence de la barrière hémato-encéphalique est semble-t-il le point le plus critique pour l'accès des molécules thérapeutiques au cerveau. Notre étude basée sur les complexes ribavirine/cyclodextrines natives sur un modèle d'infection chez l'animal se place donc dans un contexte global d'évaluation de la capacité des cyclodextrines à améliorer le traitement des pathologies du système nerveux central.

L'augmentation de l'activité antivirale de la ribavirine grâce à la formation d'un complexe avec l'alpha- ou la bêta-cyclodextrine a été démontrée *in vitro*. Le rôle des cyclodextrines devait être confirmé *in vivo* et notamment leur capacité à améliorer le traitement des infections du système nerveux central en augmentant la concentration de la ribavirine dans le cerveau.

L'objectif de notre travail a donc été d'évaluer la toxicité et l'activité antivirale *in vivo* des complexes ribavirine/alpha-cyclodextrine et ribavirine/bêta-cyclodextrine à partir d'un modèle animal d'encéphalite rougeoleuse. Ensuite, et afin de relier l'amélioration de l'activité antivirale à une augmentation de la concentration de la ribavirine au sein du tissu cérébral infecté, nous avons élaboré une technique de quantification de la ribavirine dans le cerveau et étudié la cinétique de la molécule antivirale dans le cerveau de souris saines ou infectées, traitées par la ribavirine libre ou le complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. INFECTIONS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

I.1 GENERALITES

Le système nerveux central (SNC) est constitué de l'encéphale ou cerveau, partie supérieure occupant la cavité crânienne, et de la moelle épinière, partie qui occupe le canal rachidien des vertèbres. La moelle épinière est composée de deux parties, une substance grise centrale constituée de corps cellulaires, de fibres nerveuses non myélinisées et de vaisseaux sanguins et la substance blanche périphérique constituée de fibres nerveuses myélinisées. Dans l'encéphale, la substance grise est externe dans le cortex cérébral et le cortex cérébelleux [Aimé-Genty, 1997].

Le SNC est protégé des agents infectieux par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les virus peuvent toutefois y pénétrer par voie sanguine ou par voie neuronale. Lorsque les virus sont transportés par le sang, sous forme libre ou dans les cellules, ils franchissent la BHE au niveau des capillaires sanguins du tissu nerveux ou des plexus choroïdes puis diffusent dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les espaces méningés. La physiopathologie de l'infection est reliée au tropisme du virus pour les cellules du SNC et aux conséquences cellulaires de la multiplication virale sur les cellules neuronales [Agut, 2003].

Les infections du SNC sont caractérisées par des profils d'évolution variables. Ainsi l'encéphalite à arbovirus ou la méningite à entérovirus sont des infections aiguës d'évolution rapide, tandis que les infections chroniques ou retardées peuvent être soit des infections latentes persistantes des neurones ou des cellules satellites (virus du zona et de la varicelle (VZV) ou virus herpes simplex (HSV)), soit des infections caractérisées par une production virale chronique (virus de l'immunodéficience acquise (VIH) : syndrome démentiel du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), rougeole : panencéphalite subaiguë sclérosante (PESS). Elles peuvent aussi être dues à des manifestations auto-immunitaires post-infectieuses entraînant des encéphalites démyélinisantes dues au virus de la vaccine ou de la rougeole [Agut, 2003].

I.2 EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS VIRALES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Le nombre annuel d'infections du SNC qui sont dues à un virus dépasse largement le nombre d'infections dues à des bactéries, des champignons et des protozoaires [Romero & Newland, 2003]. L'incidence des infections virales affectant le SNC reste toutefois mal connue. Pour l'ensemble des virus, l'incidence a été estimée inférieure à 0,003% tous âges confondus et inférieure à 0,020% chez les enfants âgés de moins de 16 ans. Le virus en cause est déterminé dans 20 à 40% des cas [Lau et al., 1998]. Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'accroître les connaissances sur les syndromes infectieux du SNC liés à des infections virales.

Une étude nationale, dirigée par l'Institut National de Veille Sanitaire, est actuellement en cours pour mieux caractériser les encéphalites infectieuses en France chez les patients non infectés par le VIH. Cette enquête a pour but de déterminer l'incidence, l'épidémiologie et les étiologies des encéphalites infectieuses, ainsi que les facteurs de risque de décès ou de séquelles. Le protocole de cette étude classe l'exploration des encéphalites à liquide clair en trois niveaux, en fonction de leur fréquence : niveau 1, les infections fréquentes et urgentes à VIH, HSV-1 et HSV-2 vérifiés à J4, VZV ; niveau 2, entérovirus, cytomégalovirus (CMV), virus d'Epstein Barr (EBV), herpesvirus humain 6 (HHV-6), adénovirus, virus de l'encéphalite à tique ; niveau 3, influenzavirus A et B, para-influenzavirus, virus de la rougeole, des oreillons, de la rubéole, virus West Nile, virus Toscana, virus JC et Chorioméningite lymphocytaire virale (CMVL). Les résultats préliminaires montraient, au 12 juin 2007, que sur 119 patients inclus dans l'étude, dont 15 enfants, l'étiologie avait pu être déterminée chez 47 patients, dont 18 (38%) avaient une encéphalite herpétique, 8 (17%) une encéphalite à VZV. Les encéphalites grippales, à CMV et à entérovirus représentaient chacune 1 cas (2%). Pour 26 patients l'origine de l'encéphalite n'avait pas pu être déterminée et 46 patients étaient encore en cours d'analyse [Mailles et al., 2008].

La prévalence des virus au cours des infections du SNC varie énormément d'une étude à l'autre en raison notamment de la population étudiée (population pédiatrique ou adulte), des virus recherchés, de la technique utilisée et surtout des régions du monde dans lesquelles se sont déroulées les études (Tableau 1). Par exemple une étude californienne rapporte un nombre non négligeable d'encéphalites dues au virus West Nile (15%) [Glaser et al., 2006] alors que celui-ci n'est pas présent à l'heure actuelle en Europe.

Tableau 1. Prévalence des principaux virus responsables d'infections du système nerveux central

Patients		Prlvt	Tech.	Conf.	Prévalence								Pays	Référence
Nbre	Pop.				HSV	VZV	CMV	EBV	HHV6	EV	VRS	Grippe		
200	Ad+En IC+ID	LCR	PCR	23%‡	5%	0,5%	6%*	0,5%	NR	NR	NR	NR	Brésil#	[Mendoza et al., 2007]
3231	NR	NR	NR	46%‡	11%	29%	NR	11%	NR	NR	NR	7%	Finlande#	[Koskiniemi et al., 2001]
93	En IC	LCR	PCR	48%‡	2%	5%	NR	2%	1%	7%	7%	5%	Suède‡	[Fowler et al., 2008]
119	Ad+En IC+ID	LCR	PCR	47%‡	38%	17%	2%	NR	NR	2%	NR	2%	France‡	[Mailles et al., 2008]
1570	>6 mois IC	LCR sérum Respi		16%§	26%	14%	NR	10%	NR	25%	NR	NR	Californie‡	[Glaser et al., 2006]

‡ Encéphalites, # Toutes infections du système nerveux central confondues

*3 cas de co-infections : CMV + EV et CMV + HSV

Légende : Nbre : Nombre, Pop : Population, Prlvt : Prélèvements, Tech. : Technique utilisée dans l'étude, Conf. Pourcentage de diagnostic confirmé au sein des étiologies virales (sauf §toutes étiologies infectieuses confondues), Respi : Respiratoire.

En : Enfants, Ad : Adultes, ID : Immunodéprimé, IC : Immunocompétent, NR : Non Renseigné, LCR : Liquide céphalorachidien, PCR : Réaction de polymérisation en chaîne.

HSV : Herpes simplex virus, CMV : Cytomégalovirus, EBV : Epstein Barr virus, HHV-6 : Herpes virus humain 6, VZV : Virus du zona et de la varicelle, EV : Entérovirus, VRS : Virus respiratoire syncytial.

I.3 SYNDROMES INFECTIEUX DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

I.3.1 Les méningites virales

Les méninges sont constituées par trois membranes concentriques (la pie-mère, l'arachnoïde et la dure-mère) enveloppant le SNC, le séparant de la paroi squelettique du crâne et de la colonne vertébrale, lui assurant protection et nutrition. Le terme de méningite désigne l'inflammation des méninges quelle qu'en soit la cause. Les méningites affectent, dans la grande majorité des cas, les méninges molles (pie-mère, arachnoïde et espace leptoméningé où circule le LCR). Les méningites sont le plus souvent infectieuses (dues à des bactéries, des virus, des champignons ou des parasites), mais elles peuvent être tumorales [Aimé-Genty, 1997].

Les méningites virales représentent la majorité des méningites à liquide clair. Elles sont habituellement bénignes et sont dues essentiellement aux entérovirus (coxsackie A, coxsackie B, échovirus) ou au virus ourlien, constituant une complication fréquente des oreillons. Des cas de méningite ont également été décrits pour d'autres virus tels que les adénovirus, le virus de la rubéole, les *Herpesviridae* ou le virus West Nile (Tableau 2).

Les méningites virales sont caractérisées par un LCR contenant une réaction cellulaire comprise entre quelques dizaines à 1000 éléments/mm^3 à prédominance lymphocytaire, avec parfois une formule panachée, une protéinorachie normale, ou modérément augmentée, une glycorachie normale. L'interféron alpha est élevé dans 70 à 90% des cas au stade précoce [Rozenberg, 2002].

I.3.2 Les encéphalites

L'encéphalite est une inflammation de tout ou partie de l'encéphale, quelle qu'en soit la cause. Par convention, les inflammations purulentes (abcès cérébraux) et la majorité des scléroses en plaque ne sont pas appelées encéphalites. Les encéphalites ont des expressions cliniques variées selon la cause de la maladie et selon leur caractère aigu (évolution rapide, fréquence de la fièvre, des crises épileptiques, des paralysies, du coma) ou subaigu (évolution lente, le ralentissement intellectuel étant souvent au premier plan des symptômes). Elles peuvent être dues à des agents infectieux, les virus étant de loin les plus souvent responsables [Aimé-Genty, 1997].

En France, les encéphalites virales se caractérisent par leur relative rareté, leur sévérité (quoique variable suivant le virus en cause) et le grand nombre de virus pouvant en être la cause. Les encéphalites virales s'accompagnent souvent d'une atteinte méningée (méningo-encéphalite) et parfois d'une atteinte médullaire (encéphalomyélite).

Les encéphalites virales peuvent résulter de la réplication du virus dans l'encéphale avec atteinte de la substance grise (polio-encéphalites) ou d'encéphalites post-infectieuses, résultant d'un mécanisme immunopathologique et affectant la substance blanche (leucoencéphalites).

Parmi les encéphalites primitives, l'encéphalite herpétique est une des plus fréquentes [Mailles et al., 2008].

I.3.3 Les autres atteintes neurologiques virales

I.3.3.1 Poliomyélite

La poliomyélite est une inflammation de la substance grise de la moelle épinière. Les poliovirus sont spécifiquement responsables de la poliomyélite antérieure aigue qui touche de façon préférentielle les neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle. La mort de ces neurones entraîne des paralysies atteignant de façon asymétrique et apparemment aléatoire certains muscles des membres et du tronc [Aimé-Genty, 1997]. En raison des politiques vaccinales, cette maladie est en voie d'éradication dans le monde [Muller et al., 2007].

I.3.3.2 Myélite transverse

La myélite transverse est un syndrome neurologique causé par l'inflammation de la moelle épinière. Le terme de « myélite » se rapporte à l'inflammation de la moelle épinière, alors que « transverse » décrit simplement la position de l'inflammation, c'est-à-dire dans toute la largeur de la moelle épinière. On utilise aussi le terme de myélopathie, formule plus générale désignant toute atteinte de la moelle épinière.

La myélite transverse est une affection rare, souvent consécutive à une infection virale et résultant probablement d'un mécanisme immunopathologique : les attaques dues à l'inflammation peuvent endommager ou détruire la myéline, la substance isolante qui enveloppe comme une gaine les fibres des cellules nerveuses. Cette atteinte provoque dans le système nerveux des cicatrices qui interrompent les communications entre les nerfs de la moelle épinière et le reste du corps [Aimé-Genty, 1997].

Les principaux virus responsables de myélites sont le HSV, le VZV, le CMV, les virus des oreillons et de la rubéole, l'influenzavirus et le virus West Nile (Tableau 2).

I.3.3.3 Polyradiculonévrite aiguë (Syndrome de Guillain Barré)

Le syndrome de Guillain Barré est une affection aiguë paralysante d'origine périphérique, comportant des déficits sensitifs, précédée dans les deux tiers des cas d'un épisode infectieux, le plus souvent viral des voies aérodigestives, ou plus rarement d'une vaccination. Il s'agit d'une atteinte inflammatoire des racines nerveuses résultant d'une réaction auto-immune vis-à-vis de la myéline du nerf périphérique. Les infections virales les plus souvent en cause sont dues à des virus de la famille des *Herpesviridae* : CMV, EBV, VZV [Aimé-Genty, 1997].

I.4 PRINCIPAUX VIRUS ET FAMILLES DE VIRUS RESPONSABLES D'ENCEPHALITES

Les principales étiologies virales des infections du SNC sont référencées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Principales étiologies des infections virales du système nerveux central

Virus	Infection	Prévalence	Syndrome	Epidémiologie		Délai d'apparition	Référence
				Enfant	Adulte		
Adénovirus *Adenoviridae*	Primo-infection ou réactivation	/	Encéphalite Méningite Méningo-encéphalite	IC ou ID	IC ou ID	/	[Ryan, 2001] [Lema et al., 2005] [Carrigan, 1997] [Dubberke et al., 2006]
Herpes simplex virus *Herpesviridae*	Primo-infection ou réactivation	/	Encéphalite Méningo-encéphalite	IC	/	/	[Mendoza et al., 2007] [Glaser et al., 2006] [Spiegel et al., 2008]
Virus du zona et de la varicelle *Herpesviridae*	Primo-infection ou réactivation	< 1% (PI)	Encéphalite Méningite Myélite	IC	/	Qqes jours à 4 ans	[Hausler et al., 2002] [Koskiniemi et al., 2001] [Kleinschmidt-DeMasters & Gilden, 2001; Leahy et al., 2008]
Herpesvirus humain 6 *Herpesviridae*	Primo-infection ou réactivation	/	Convulsions Encéphalites Méningite Méningo-encéphalites	IC	IC ou ID	/	[Kleinschmidt-DeMasters & Gilden, 2001] [Tavakoli et al., 2007]

Légende : ID : Immunodéprimé, IC : Immunocompétent, NR : Non Renseigné

[#]Virus émergents selon Romero & Newland (2003)
*Encéphalites dites "américaines" selon Davis et al. (2008)
[‡]Virus à ARN hautement pathogènes selon Holbrook & Gowen (2008)

Virus	Infection	Prévalence	Syndrome	Epidémiologie Enfant	Epidémiologie Adulte	Délai d'apparition	Référence
Cytomégalovirus *Herpesviridae*	/	/	Encéphalites Méningite Myélites transverses	/ NNé	ID>IC IC IC	/	[Arribas et al., 1996; Kleinschmidt-DeMasters & Gilden, 2001; Rafailidis et al., 2008]
Virus d'Epstein Barr *Herpesviridae*	Mononucléose infectieuse	< 0,5%	Encéphalite Méningite Lymphome	IC IC ID		/	[Kleinschmidt-DeMasters & Gilden, 2001]
Virus La Crosse* *Bunyaviridae*	Primo-infection	0,3 à 4%	Encéphalite	++	-		[Romero & Newland, 2003]
Jamestown Canyon virus *Bunyaviridae*			Encéphalites Méningites	-	+		[Romero & Newland, 2003]
Encéphalite à Tique#‡ *Flaviviridae*	/	10 000 à 13 000 / an	Encéphalite	/	/	/	[Kunze, 2006; Lindquist & Vapalahti, 2008]
Virus West Nile#‡* *Flaviviridae*		3500 cas USA (2002)	Encéphalite Méningite Myélite	/	/	/	[Solomon et al., 2003]

Légende : ID : Immunodéprimé, IC : Immunocompétent, NR : Non Renseigné

#Virus émergents selon Romero & Newland (2003)
*Encéphalites dites "américaines" selon Davis et al. (2008)
‡Virus à ARN hautement pathogènes selon Holbrook & Gowen (2008)

Virus	Infection	Prévalence	Syndrome	Epidémiologie Enfant	Epidémiologie Adulte	Délai d'apparition	Référence
Encéphalite Japonaise[#‡] *Flaviviridae*	/	35 000 à 50 000 / an	Encéphalite	/	/	/	[Solomon, 2003]
Encéphalite de Saint Louis[‡*] *Flaviviridae*	/	4605 cas depuis 1965	Encéphalite Myélite transverse Méningite		IC ou ID	4-21 j	[Davis et al., 2008; Romero & Newland, 2003; Wasay et al., 2000]
Virus Powassan[‡*] *Flaviviridae*	Primo-infection	30 cas depuis 1950	Encéphalite	60%	/	/	[Romero & Newland, 2003]
Dengue[‡*] *Flaviviridae*	Primo-infection	1-18%	Encéphalite Encéphalopathie Myélite Syndrome de Guillain barré		IC	3-23 j	[Wasay et al., 2008] [Soares et al., 2008; Solomon & Mallewa, 2001]
Influenza A ou B[‡] *Orthomyxoviridae*	Primo-infection	Enf > Ad	Encéphalite, myélite Syndrome de Reye, Syndrome de Guillain Barré	IC	IC	Qques jours à 1 semaine	[Studahl, 2003]
Virus des oreillons *Paramyxoviridae*	Primo-infection	9,8%	Méningite ++ Encéphalite aiguë/chronique Myélite transverse	/	/	Qques jours < 23 jours /	[Poggio et al., 2000] [Russell & Donald, 1958]

Légende : ID : Immunodéprimé, IC : Immunocompétent, NR : Non Renseigné

[#]Virus émergents selon Romero & Newland (2003)
*Encéphalites dites "américaines" selon Davis et al. (2008)
[‡]Virus à ARN hautement pathogènes selon Holbrook & Gowen (2008)

Virus	Infection	Prévalence	Syndrome	Epidémiologie Enfant	Epidémiologie Adulte	Délai d'apparition	Référence
Virus respiratoire syncytial *Paramyxoviridae*	Bronchiolite	1,2%-1,8%	Convulsions Encéphalopathie	< 14 ans	/	/	[Sweetman et al., 2005] [Willson et al., 2003]
Virus de la rougeole *Paramyxoviridae*	Primo-infection	0,1% / $1/10^6$	Encéphalite aiguë Encéphalite Panencéphalite subaiguë sclérosante	/	ID IC	Qques jours Mois-années Mois-années	[Schneider-Schaulies et al., 2003]
Hendra‡ *Paramyxoviridae*	Primo-infection	/	Encéphalite Leptoméningée	/	/	/ > 1 an	[Hooper et al., 2001; Williamson et al., 2001]
Nipah‡ *Paramyxoviridae*	Primo-infection Rechute	/	Encéphalite	-	+	2 semaines à 2 ans	[Chadha et al., 2006; Wild, 2008]
Entérovirus *Picornaviridae*	/	25%	Poliomyélite Encéphalite méningite	/	/	/	[Mirand et al., 2008]
Colorado Tick fever* *Reoviridae*	Primo-infection	20 à 40/an	Méningite Encéphalite	1/3	/	3-14 jours	[Romero & Newland, 2003]

Légende : ID : Immunodéprimé, IC : Immunocompétent, NR : Non Renseigné

#Virus émergents selon Romero & Newland (2003)
*Encéphalites dites "américaines" selon Davis et al. (2008)
‡Virus à ARN hautement pathogènes selon Holbrook & Gowen (2008)

Virus	Infection	Prévalence	Syndrome	Epidémiologie		Délai d'apparition	Référence
				Enfant	Adulte		
Virus de l'immunodéficience humaine[#] *Retroviridae*	/	20-30%	Démence Encéphalite	/	/	/	[Albright et al., 2003] [Masliah et al., 2000]
Encéphalite équine du Venezuela[‡*] *Togaviridae*	/	rare	Encéphalite	/	/		[Davis et al., 2008; Gardner et al., 2008; Garmashova et al., 2007]
Encéphalite équine de l'est[‡*] *Togaviridae*	Primo-infection	23 cas (1998-2000)	Encéphalite	20%	/	3 jours - 3 semaines	[Romero & Newland, 2003]
Encéphalite équine de l'ouest[‡*] *Togaviridae*	Primo-infection	7 cas (1987-2002)	Encéphalite Méningite	++	+		[Nagata et al., 2005; Romero & Newland, 2003]
Virus de la rubéole *Togaviridae*	/	1/3 000 à 1/24 000	Encéphalite Méningite Myélite transverse Syndrome de Guillain Barré	IC	/	/	[Guler et al., 2007] [Lau et al., 1998]
Chikungunya *Togaviridae*	Primo-infection		Encéphalite Encéphalopathie	IC	IC		[Casolari et al., 2008; Robin et al., 2008]

Légende : ID : Immunodéprimé, IC : Immunocompétent, NR : Non Renseigné

[#]Virus émergents selon Romero & Newland (2003)
*Encéphalites dites "américaines" selon Davis et al. (2008)
[‡]Virus à ARN hautement pathogènes selon Holbrook & Gowen (2008)

I.5 PHYSIOPATHOLOGIE

De nombreux virus utilisent la voie hématogène pour accéder au cerveau, comme le VIH, le virus JC, les alphavirus, le CMLV, les flavivirus. Ces virus nécessitent généralement une réplication importante au niveau extraneuronal pour générer une virémie élevée et persistante nécessaire pour délivrer le virus au niveau du SNC. Les virus, pour passer du lumen des vaisseaux sanguins au SNC, doivent traverser la BHE et même si cette barrière biologique est assez bien caractérisée, le mécanisme par lequel les virus la traversent et atteignent le parenchyme du SNC est mal connu. Certains petits virus semblent pouvoir pénétrer directement au travers des capillaires; les virus sont parfois capables d'infecter l'endothélium ou d'autres couches des vaisseaux sanguins et de se multiplier au travers de la barrière [Murphy & Nathanson, 1997]. La voie neurogène est utilisée par les herpesvirus et le virus de la rage pour atteindre le SNC. Ceci implique que le virus pénètre dans le système nerveux périphérique et s'y réplique, puis que le génome transite dans l'axone de la fibre nerveuse, avec ou sans infection de la gaine de myéline. Cette voie assure au virus une protection maximale contre les mécanismes de défense immunitaire de l'organisme et facilite l'établissement d'une latence ou d'une progression lente de l'infection [Murphy & Nathanson, 1997].

Les virus à ARN hautement pathogènes responsables d'encéphalites (Tableau 2) induisent une inflammation systémique, mais dans une forme atténuée par rapport aux agents de fièvres hémorragiques. L'infection de l'Homme est accidentelle et constitue un cul de sac virologique dans le cycle de réplication. La plupart des personnes infectées par ces agents pathogènes développent seulement un syndrome grippal non spécifique, et, dans un petit nombre de cas, le virus traverse la paroi endothéliale du système cérébro-vasculaire et infecte le cerveau. La charge virale infectante nécessaire et la voie de progression de l'infection ne sont pas connues, même s'il a été démontré que le virus progresse à partir du site de la piqûre, se réplique dans les ganglions lymphatiques puis traverse la BHE à partir de la circulation générale et entre dans le SNC. Différents mécanismes ont été proposés, notamment la pénétration du virus au profit de l'inflammation et des modifications de l'intégrité vasculaire qui en résulte, l'entrée *via* le bulbe olfactif, ou *via* les Toll-like récepteurs ou une transcytose à travers les cellules de l'endothélium vasculaire [Holbrook & Gowen, 2008].

Après avoir accédé au cerveau, les virus peuvent causer des signes et des symptômes au sein du SNC par une action directe ou indirecte au niveau du tissu neuronal. La réplication du virus peut porter atteinte directement à l'intégrité de la cellule cible au cours d'une infection disséminée du cerveau et des méninges. Parfois, les virus infectent spécifiquement certains types cellulaires ce qui explique les différentes symptomatologies ; le virus de la poliomyélite infecte les neurones moteurs, la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP), due au virus JC, fait suite à l'infection des oligodendrocytes et le virus herpes simplex infecte préférentiellement le lobe temporal [Tunkel & Scheld, 2000].

Au cours des infections virales, l'hôte peut développer une réponse immunitaire non seulement vis à vis de l'agent infectieux mais également vis à vis des protéines de la myéline. Cette réaction immunitaire contre la myéline périphérique entraîne une démyélinisation qui, lorsqu'elle est totale au niveau des nerfs périphériques, est à l'origine du syndrome de Gillain-Barré. Il n'a pas été démontré si l'infection du SNC était un pré-requis au développement d'une pathologie aiguë démyélinisante faisant suite à un exanthème ou une infection respiratoire [Griffin, 2000].

I.6 MODELES ANIMAUX

Le développement et l'utilisation de modèles animaux pour l'étude de la pathogenèse sont essentiels au développement de molécules antivirales efficaces et de vaccins. Les virus responsables d'encéphalites chez l'Homme provoquent fréquemment des pathologies neurologiques chez la souris, faisant de celle-ci un outil fondamental pour l'étude des pathologies virales et pour le développement de vaccins et d'antiviraux. D'autres animaux ont été testés comme le cobaye, le chat ou les primates non humains (singe rhésus et macaque). Pour ces virus, l'inoculation par voie périphérique est généralement suffisante pour entraîner une pathologie neurologique dans le modèle établi et le développement d'une encéphalite ou d'une pathologie neurologique chez un modèle animal est généralement manifeste, avec des paralysies et des crises qui sont des indications mesurables de la maladie. La limite des tests *in vivo* est généralement la détermination de l'efficacité antivirale, souvent évaluée par le taux de morbidité ou de mortalité et la corrélation entre la pathogenèse chez l'Homme et l'animal [Holbrook & Gowen, 2008].

Exemples de modèles animaux pour les virus à ARN hautement pathogènes

Au sein de la famille des *Paramyxoviridae*, les virus Nipah et Hendra sont des agents d'encéphalites sévères chez l'Homme, consécutives à un contact rapproché avec, respectivement, un cochon ou un cheval infecté. L'infection du porc par le virus Nipah est à l'origine d'un syndrome respiratoire rarement observé chez l'Homme [Weingartl et al., 2005]. L'infection du hamster par voie intranasale ou intrapéritonéale induit une pathologie proche de celle observée chez l'Homme, c'est-à-dire une encéphalite aiguë [Wong et al., 2003]. L'infection du chat, naturellement sensible au virus, par voie sous-cutanée, ne semble pas s'approcher de la pathologie observée chez l'Homme, malgré des similitudes évidentes dans la physiopathologie [Mungall et al., 2006].

Les flavivirus associés à une encéphalite sévère sont présents partout dans le monde et transmis par des moustiques ou des tiques. Les virus du complexe de l'encéphalite japonaise sont généralement létaux chez le souriceau nouveau-né et les animaux développent des pathologies neurologiques sévères, avec toutefois des variations en fonction de la souche de virus. Le hamster a également été utilisé pour le virus de l'encéphalite japonaise et le virus West Nile. Les virus du complexe de l'encéphalite à tique causent généralement des encéphalites létales chez la souris, avec des variations en fonction de l'âge et de la voie d'inoculation. D'autres animaux ont été testés pour l'infection par le virus de l'encéphalite à tique, incluant le cobaye, le hamster, le rat et les primates non humains [Holbrook & Gowen, 2008].

Enfin, les modèles viraux d'encéphalites dues aux alphavirus de la famille des *Togaviridae* reposent sur l'utilisation de souris, de hamsters, de cobayes ou de primates non humains [Holbrook & Gowen, 2008].

I.7 DIAGNOSTIC DES INFECTIONS VIRALES NEURO-MENINGEES

I.7.1 Diagnostic direct

Il correspond à la mise en évidence du virus ou de ses constituants dans le LCR ou plus rarement dans le tissu cérébral (biopsie).

L'isolement du virus est la méthode de référence. Les prélèvements de LCR sont inoculés aux cultures cellulaires. Le taux de réussite de l'isolement viral dépend du type de virus mais également de la date du prélèvement par rapport au début de l'infection, qui doit être le plus précoce possible, avant l'apparition des anticorps capables de complexer le virus, et avant tout traitement antiviral. Il dépend également des conditions de stockage et de transport des échantillons : ceux-ci doivent être acheminés le plus rapidement possible, à +4°C, ou à défaut stockés à -80°C [Rozenberg, 2002].

Actuellement le diagnostic des infections virales du SNC repose essentiellement sur la mise en évidence du génome viral dans le LCR par PCR, précédée d'une étape de rétrotranscription (RT-PCR) pour les virus à ARN [Rozenberg, 2002].

I.7.2 Diagnostic indirect

I.7.2.1 Dosage de l'interféron alpha dans le LCR

La synthèse d'interféron alpha est induite par certains composants viraux. Cette synthèse est précoce, de courte durée et présente dans la majorité des cas au cours des méningites et des encéphalites virales primitives. Elle est absente au cours des encéphalopathies post-infectieuses.

I.7.2.2 Sérologie

Lorsque les prélèvements sont réalisés à un stade tardif, le diagnostic est sérologique. Dans le sérum, la mise en évidence d'une séroconversion et/ou la présence d'IgM est très évocatrice de l'étiologie virale de l'encéphalite. L'augmentation du titre d'anticorps sur deux prélèvements séparés de 10 à 15 jours est significative si le rapport des titres est supérieur à quatre.

Dans le LCR, la mise en évidence d'une synthèse intra-thécale d'anticorps nécessite l'obtention de sérum et de LCR prélevés au début des signes cliniques, puis après 10 à 15 jours.

De nombreux virus à ARN responsables d'encéphalites, incluant la rougeole, le virus West Nile, les virus de l'encéphalite à tique et de l'encéphalite japonaise, sont sensibles à la ribavirine. Dans ce contexte, nous avons développé un modèle animal d'encéphalite aiguë due au virus de la rougeole. Ce modèle repose sur l'inoculation intracrânienne de la souche neurovirulente CAM/RB à des souris CBA/ca, sensibles au virus.

II. LE VIRUS DE LA ROUGEOLE

II.1 CLASSIFICATION

Le virus de la rougeole appartient à l'ordre des Mononégavirales, virus dont le génome est constitué d'un ARN non segmenté de polarité négative. Cet ordre est constitué de quatre familles : *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*.

La famille des *Paramyxoviridae* est divisée en deux sous-familles, les *Pneumovirinae* et les *Paramyxovirinae* à laquelle appartient le virus de la rougeole (VR) ou *Measles virus* au sein du genre *Morbillivirus* [Freymuth, 2003].

II.2 HISTORIQUE

Le genre *Morbillivirus* auquel appartient le virus de la rougeole contient également de nombreux virus animaux tels que le virus de la maladie de Carré (CDV, *Canine distemper virus*) et le virus animal de la peste bovine, dont le virus de la rougeole serait issu. Le virus se serait progressivement adapté à l'Homme au temps de l'Egypte ancienne, à la faveur d'une proximité très importante entre les animaux et les Hommes [McNeill, 1976; Norrby et al., 1985].

La première description clinique précise de la rougeole remonte au Xème siècle, mais la première observation serait due à un médecin Hébreu du VIIème siècle, El Yehudi [Freymuth, 2003].

Le virus de la rougeole a été isolé pour la première fois en 1954, par Enders et Peebles à partir du sang d'un enfant infecté [Enders et al., 1957]. Ce premier isolat, nommé souche Edmonston, est à l'origine des vaccins atténués actuellement utilisés.

II.3 EPIDEMIOLOGIE ET TRANSMISSION

Il existe 23 génotypes du virus de la rougeole (détectés d'après 45 nucléotides de la région C-terminale du gène N et du gène de l'hémagglutinine), mais il n'existe qu'un seul sérotype [Muller et al., 2007]. En Europe, les principales épidémies sont dues aux génotypes D4, D6 et B3. Les autres génotypes isolés (B2, D5, D8, D9, G2 et H1) sont à l'origine d'un nombre limité de cas, importés d'autres continents [Kremer et al., 2008].

Le virus de la rougeole fait partie des virus les plus contagieux ; il reste contagieux dans l'air ou sur des surfaces infectées pendant plus de deux heures, s'affranchissant ainsi d'un contact interhumain direct.

La rougeole est une maladie éradicable puisque l'homme est le seul réservoir et que les infections dues à la souche sauvage du virus, ainsi que la vaccination, confèrent une immunité durable. Le taux de vaccination contre le virus de la rougeole a augmenté de 71% en 1999 à 76% en 2004, et 51% des pays ont atteint un taux de couverture vaccinale supérieure à 90% soit en introduisant un vaccin en double dose, soit par des campagnes massives de vaccination. La transmission reste endémique en Afrique et en Asie du Sud où la couverture vaccinale est passée respectivement de 50 à 66% et de 59 à 63% sur la même période [Muller et al., 2007].

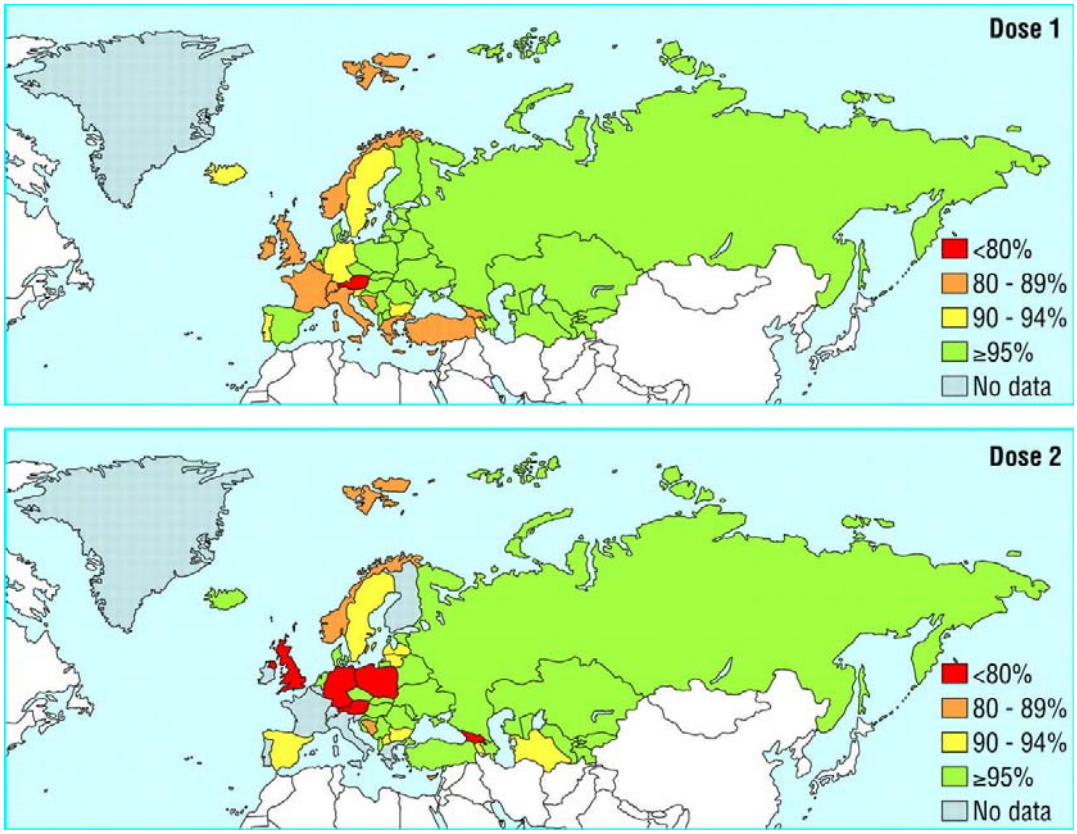


Figure 1. Taux de couverture vaccinale rougeole (doses 1 et 2), en 2004, pour les pays membres de la région européenne de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2004 (Copyright ©2006 BMJ Publishing Group Ltd., Asaria, P. et al. BMJ 2006; 333:890-895)

En Europe, en 2005, la couverture vaccinale était supérieure à 95% dans 31 pays sur 52 soit 59,6% [Kremer et al., 2008].

La vaccination contre le virus de la rougeole n'induit pas d'immunité fiable chez l'enfant avant la disparition des anticorps maternels, ce qui entraîne un faible taux de séroconversion chez les enfants âgés de moins de 12 mois. L'efficacité de la vaccination augmente jusqu'à 90% chez les enfants âgés de 12 à 15 mois. Même avec un taux vaccinal de 100%, un schéma vaccinal à une seule dose entraîne la persistance progressive d'une population sensible au virus. Une seconde dose de vaccin permet d'atteindre un taux de 99% d'immunité vaccinale. Ainsi, une vaccination de 90 à 95% de la population avec un schéma vaccinal de deux injections est nécessaire pour interrompre la transmission endémique de la rougeole (Figure 1). Le plan stratégique 2005-2010 de la région européenne de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a comme objectif l'interruption de la transmission endémique de la rougeole [Asaria & MacMahon, 2006]. En France, la rougeole est une maladie à déclaration obligatoire depuis le 4 juillet 2005.

En dépit de cela, la rougeole demeure une importante cause de décès dans le monde. La mortalité due à la rougeole est plus élevée chez les enfants âgés de moins de 12 mois et dans les pays en voie de développement [Asaria & MacMahon, 2006]. Selon l'OMS, la mortalité atteint 454 000 décès en 2004, soit une diminution de 39% depuis 1999. La rougeole est responsable de 4% des six millions de morts chez les enfants de moins de cinq ans [Muller et al., 2007]. En Europe, en 2005 et 2006, la rougeole a touché respectivement 36 426 et 55 578 personnes et entraîné quatorze et neuf décès [Kremer et al., 2008].

Un enfant sur un million, infecté par la souche sauvage du virus de la rougeole, développera une panencéphalite subaiguë sclérosante (PESS) six à dix ans plus tard, notamment s'il a moins de deux ans au moment de l'infection. La souche vaccinale du virus n'induit pas de chronicité [Bellini et al., 2005].

II.4 STRUCTURE

Le virus de la rougeole est un virus enveloppé comprenant une nucléocapside hélicoïdale. Le génome ARN simple brin de polarité négative, composé de 15 000 paires de base, est constitué de six gènes codant respectivement pour la nucléocapside (N), la phosphoprotéine (P), les protéines de matrice (M) et de fusion (F), l'hémagglutinine (H) et la protéine large (L) (Figure 2). L'ARN viral est encapsidé avec la protéine N et forme le complexe ribonucléoprotéique en association avec l'ARN polymérase ARN dépendante

composée des protéines L et P. La protéine M, qui tapisse la surface interne de l'enveloppe, joue un rôle dans le bourgeonnement du virus et dans la régulation de la transcription. Elle assure le maintient de l'architecture du virion mais est séparée du core au moment de l'entrée du virus dans la cellule. Le gène P code également pour les protéines additionnelles V et C, respectivement par un mécanisme d'édition de l'ARN et de glissement du cadre ouvert de lecture. Les fonctions des protéines V et C ne sont pas complètement connues à ce jour mais certaines de leurs fonctions sont liées à des activités antagonistes de l'interféron. L'enveloppe lipidique contient deux glycoprotéines d'enveloppe, les protéines H et F, qui sont responsables respectivement de la liaison au récepteur et de la fusion des membranes et qui sont impliquées au cours de l'entrée du virus dans la cellule et du bourgeonnement. La glycoprotéine H, constituée de deux ou trois molécules identiques, possède une activité hémagglutinante, mais pas d'activité neuraminidasique. Ces deux glycoprotéines entraînent l'apparition d'anticorps neutralisants et inhibiteurs d'hémagglutination [Lamb & Kolakoksky, 1995].

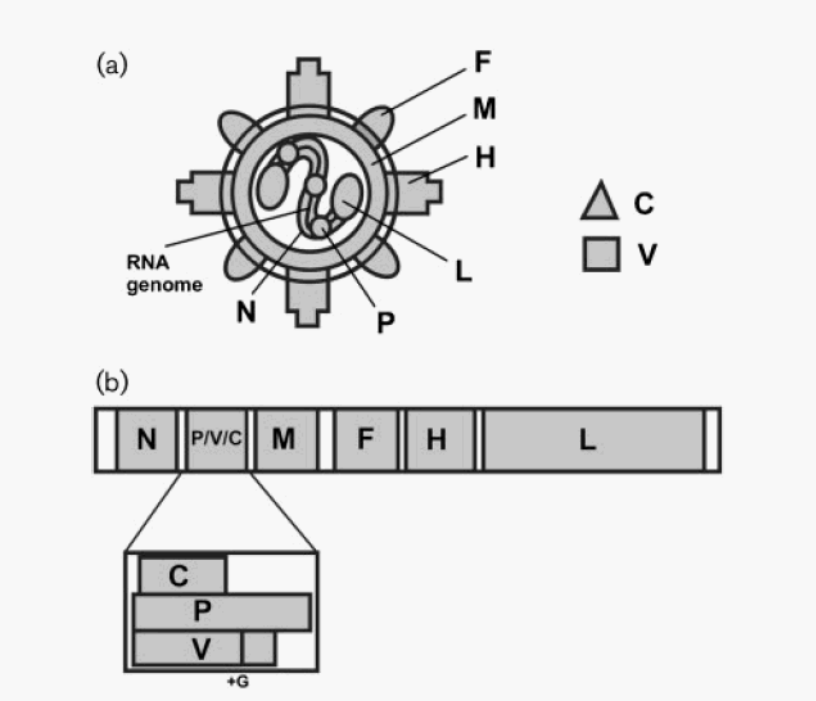


Figure 2. Schéma de la structure du virus de la rougeole et de son génome [Yanagi et al., 2006a]

II.5 REPLICATION VIRALE

Toutes les étapes du cycle de réplication des virus de la famille des *Paramyxoviridae* se déroulent dans le cytoplasme de la cellule. La réplication débute par l'attachement du virus de la rougeole à la cellule cible par l'intermédiaire de la protéine H et de l'un des récepteurs cellulaires spécifiques, CD46 ou SLAM. La fusion des membranes virales et cellulaires, grâce aux protéines F et H du virus, permet la libération de la capside dans le cytoplasme cellulaire. Une fois les étapes de transcription, traduction et réplication terminées, le virus sort de la cellule par bourgeonnement (Figure 3). La présence des protéines d'enveloppe, H et F, à la surface de la membrane de la cellule infectée permet la transmission du virus de cellule à cellule et la formation de syncytium [Horikami & Moyer, 1995].

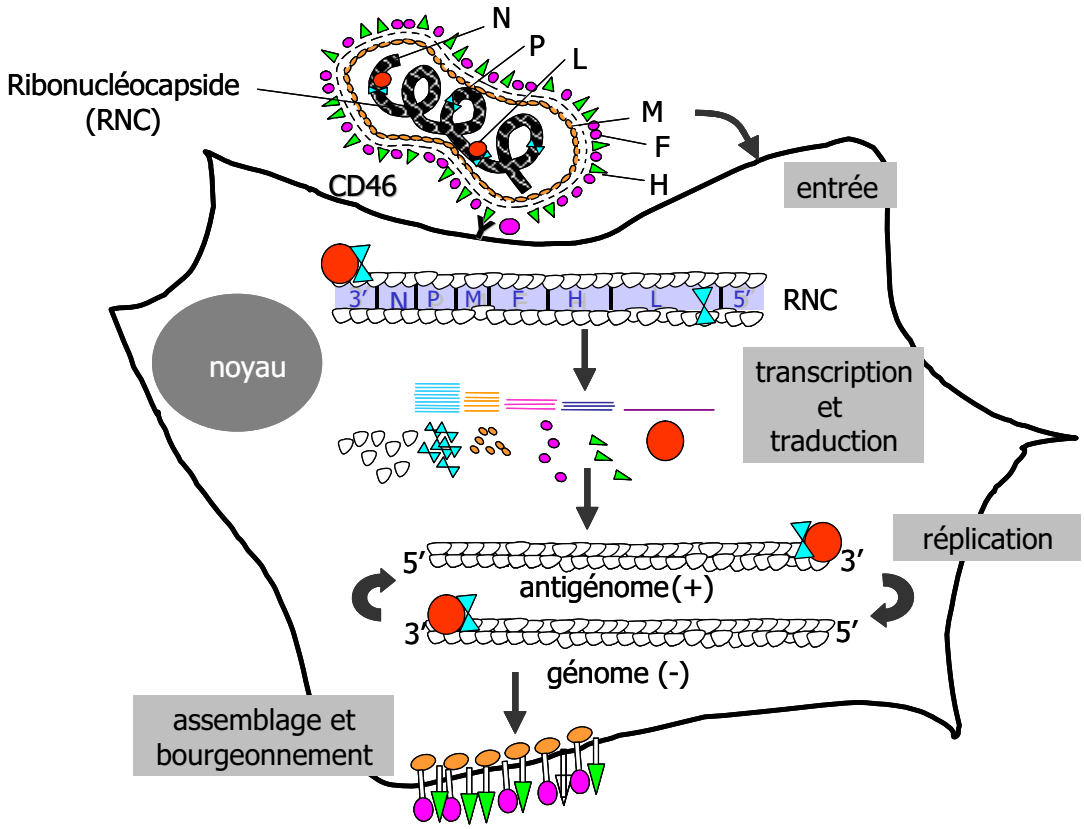


Figure 3. Cycle de réplication du virus de la rougeole (d'après P. Lebon, Université René Descartes Paris 5)

II.5.1 Absorption et entrée du virus

II.5.1.1 Structure et fonction des récepteurs du virus de la rougeole

Les cellules doivent être à la fois sensibles et permissives au virus pour permettre une infection virale complète. Les deux molécules CD46 (Protéine cofacteur membranaire) et SLAM (*Signaling lymphocyte activation molecule*), aussi appelée CD150, ont été identifiées comme étant des récepteurs du virus de la rougeole.

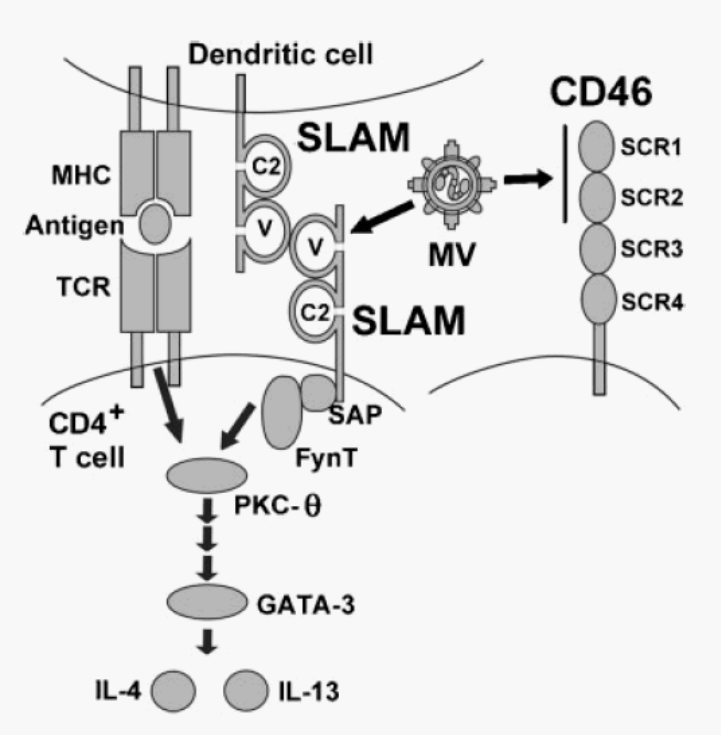


Figure 4. Récepteurs SLAM et CD46 du virus de la rougeole [Yanagi et al., 2006a]

Le récepteur CD46 est un régulateur de l'activation du complément qui lie les produits C3b et C4b du complément. Il agit comme un cofacteur dans l'inactivation protéolytique de C3b/C4b, protégeant ainsi les cellules humaines de l'attaque autologue par le complément. Il existe de multiples isoformes de CD46 qui sont générées par épissage alternatif d'un même gène. Il est constitué de quatre séquences consensus courtes répétées (SCR 1-4) comportant chacune 60 à 64 acides aminés (Figure 4). En plus de sa fonction d'inhibiteur de l'activation du complément, CD46 est impliqué dans la modulation des fonctions des cellules T, la production de cellules T-régulatrices et le contrôle de la production d'interféron. CD46 sert

également de récepteur pour d'autres virus comme l'HHV-6 et différents sérotypes d'adénovirus ou bactéries (*Streptococcus pyogenes* et *Neisseria* spp) [Yanagi et al., 2006b].

Le récepteur SLAM est exprimé sur les thymocytes immatures, les cellules T mémoire, certaines cellules B, les macrophages et les cellules dendritiques matures. Après stimulation par des antigènes ou des mitogènes, toutes les cellules T et B expriment CD150. SLAM possède deux domaines extracellulaires de la superfamille des immunoglobulines, V et C2 (Figure 4), qui peuvent être associées à la protéine SAP (*SLAM-associated protein*) dans sa partie cytoplasmique [Yanagi et al., 2006b].

II.5.1.2 Interaction entre la protéine H du virus de la rougeole et les récepteurs

CD46 agit comme récepteur pour les souches issues de la souche Edmonston et la plupart des souches isolées sur cellules Vero. La liaison du virus de la rougeole à CD46 implique une interaction entre l'hétérodomaine de la protéine H du virus et les parties SCR1 et SCR2 de CD46. En conséquence, toutes les isoformes de CD46 peuvent agir comme des récepteurs pour ces souches de virus de la rougeole. Par ailleurs, SLAM peut servir de récepteur pour toutes les souches du virus de la rougeole. Le domaine V du récepteur humain SLAM est nécessaire et suffisant pour les fonctions de récepteur au virus de la rougeole et les acides aminés 60, 61 et 63 sont indispensables à cette fonction. Toutefois, il n'a pas été démontré si ces trois résidus interagissaient directement avec la protéine H du virus parce que la structure tridimensionnelle de la protéine H ou de SLAM n'a pas été déterminée [Yanagi et al., 2006b].

II.5.2 Fusion

Après l'adsorption du virus au récepteur cellulaire, la membrane virale fusionne avec la membrane cellulaire entraînant le relargage de la nucléocapside hélicoïdale dans le cytoplasme. La fusion est non pH-dépendante. La liaison de la protéine H au récepteur cellulaire entraîne un changement conformationnel de la protéine H, ainsi que de la protéine F adjacente. Le peptide hydrophobe de fusion, présent au sein de la protéine F, est ainsi exposé et inséré dans la membrane plasmique de la cellule cible. D'autres changements structuraux de la protéine F sont probablement à l'origine de l'initiation de la fusion de la

protéine virale avec la membrane de la cellule hôte. Dans la particule virale, la protéine de matrice M est en contact étroit avec la nucléocapside. Au cours de la fusion et du relargage de la nucléocapside, un mécanisme encore inconnu à ce jour, permet la rupture des liens entre les protéines N et M [Griffin, 1995].

II.5.3 Transcription

Comme la réplication du virus de la rougeole a lieu exclusivement dans le cytoplasme, le virus doit utiliser ses propres enzymes pour la transcription, toutefois certaines protéines cellulaires pourraient être impliquées. L'ARN polymérase du virus de la rougeole débute la transcription de l'ARN de la nucléocapside à partir du nucléotide terminal de l'extrémité 3', synthétisant un brin d'ARN majeur, nommé *leader*, de polarité positive, constitué de 55 nucléotides. La transcription se déroule ensuite de façon séquentielle en suivant l'ordre des gènes, entraînant la synthèse des ARNm individuels N, P/C/V, M, F, H et L. La polymérase se détache à priori de la nucléocapside au niveau des régions intergéniques avec une fréquence grandissante en fonction de la distance entre la limite du gène et le promoteur, conduisant à l'accumulation polaire des ARNms. La quantité d'ARNm produit est le facteur principal déterminant la quantité de protéine synthétisée. Les fréquences de transcription des ARNm dans les cellules infectées, rapportées à l'ARNm de N (100%), sont respectivement 81% (P), 67%(M), 45%(F), 39% (H). A la fin de chaque limite du gène, excepté pour le gène *leader* qui n'est pas traité, la polymérase termine probablement la synthèse après une polyadénylation et ensuite se ré-initie au niveau de la séquence consensus du gène suivant sans transcrire les trinucléotides intergéniques. Comme pour les ARNm des eucaryotes, les ARNms viraux sont modifiés à leurs extrémités 3' et 5'. Les ARNm du virus de la rougeole sont coiffés et méthylés à l'extrémité 5' avec une structure 7mGpppAm . Le mécanisme de cette opération n'est pas connu, toutefois la séquence consensus conservée au début de chaque gène peut spécifier l'initiation de la synthèse, du coiffage et de la méthylation des ARNm en 5'. A la région "stop" de chaque gène se situe une séquence riche en adénine et uracile suivie par 3 à 7 uracile, qui est probablement le signal de polyadénylation des ARNms [Griffin, 1995].

La transcription du gène P de la plupart des paramyxovirus a une autre particularité, nommée édition de l'ARNm. Ainsi, la moitié des ARNm P est complémentaire de l'ARN génomique et l'autre moitié est altérée par l'insertion d'une guanosine à la position 752,

donnant un autre ARNm (V). L'édition de l'ARN serait une fonction de la polymérase, probablement la protéine L.

II.5.4 Réplication

La caractéristique de la réplication de l'ARN chez les virus à génome de polarité négative, et qui le distingue de la transcription, est que la synthèse des génomes de polarité positive et négative est couplée à l'encapsidation avec la protéine N, alors que les ARNm restent non encapsidés. L'ARN polymérase virale responsable de la réplication du génome ARN est probablement le même complexe protéique P-L qui catalyse la transcription et ce serait la disponibilité de la protéine N qui régulerait la transition de la transcription à la réplication. La protéine N, normalement insoluble, est complexée à la protéine P pour former un substrat soluble utilisé pour l'encapsidation. Pour initier celle-ci, l'ARN polymérase catalyse la liaison de la protéine N à partir du complexe (libérant P) au brin d'ARN *leader* naissant. L'encapsidation concomitante de l'ARN synthétisé à la protéine N masque la séquence consensus à la frontière de chaque gène, empêchant la terminaison et la production de l'ARNm au profit de la synthèse d'un ARN génomique total encapsidé [Griffin, 1995].

II.5.5 Assemblage du virion et relargage

Comme au cours des autres étapes du cycle de réplication des *Paramyxovirinae*, le site intracellulaire d'assemblage de la nucléocapside est le cytoplasme. Les nucléocapsides s'assemblent en deux étapes : l'association de sous-unités libres de la protéine N avec le génome ARN pour former la structure hélicoïdale de la ribonucléoprotéine, puis l'association du complexe protéique P-L. L'assemblage de l'enveloppe virale a lieu à la surface de la cellule. Dans les cellules épithéliales polarisées, les *Paramyxovirinae* bourgeonnent uniquement à la surface apicale. Les protéines virales de structure sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et subissent une étape de maturation conformationnelle avant d'être transportées jusqu'à la membrane plasmique.

Le mécanisme d'assemblage de la particule virale au niveau de la membrane plasmique n'est pas connu à ce jour, mais la protéine M joue probablement un rôle majeur dans ce processus, en se liant d'une part avec les glycoprotéines de la membrane et d'autre part avec la nucléocapside. Lors de l'infection de cellules sensibles, le virus de la rougeole entraîne une

fusion de cellule à cellule produisant des cellules géantes multinucléées, l'effet cytopathogène caractéristique de l'infection par le virus de la rougeole [Griffin, 1995].

II.6 PHYSIOPATHOLOGIE

II.6.1 Réplication *in vivo*

Le virus de la rougeole est transmis par voie aérienne. Il se multiplie dans l'épithélium respiratoire du rhino- et de l'oropharynx. Deux hypothèses de dissémination sont proposées, soit le virus de la rougeole infecte les cellules de l'épithélium respiratoire en premier lieu, par une voie indépendante des récepteurs SLAM et CD46, mais peu efficace, ce qui n'expliquerait pas la contagiosité de la rougeole. Soit les premières cibles de l'infection sont les cellules SLAM+ du système immunitaire dans le tractus respiratoire, comme les monocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes, plutôt que les cellules épithéliales. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la plupart des monocytes $CD14^+$ des amygdales expriment SLAM chez l'Homme. Le virus gagne ensuite les ganglions lymphatiques locaux, par l'intermédiaire des macrophages notamment, puis le sang. L'infection des leucocytes conduit à une virémie primaire (Figure 5). La réplication virale dans les tissus lymphoïdes entraîne un virémie secondaire plus intense qui est à l'origine de la généralisation de l'infection à tous les organes (épithéliums respiratoire, oculaire, urinaire, intestinal, vaisseaux sanguins, SNC) [Yanagi et al., 2006a].

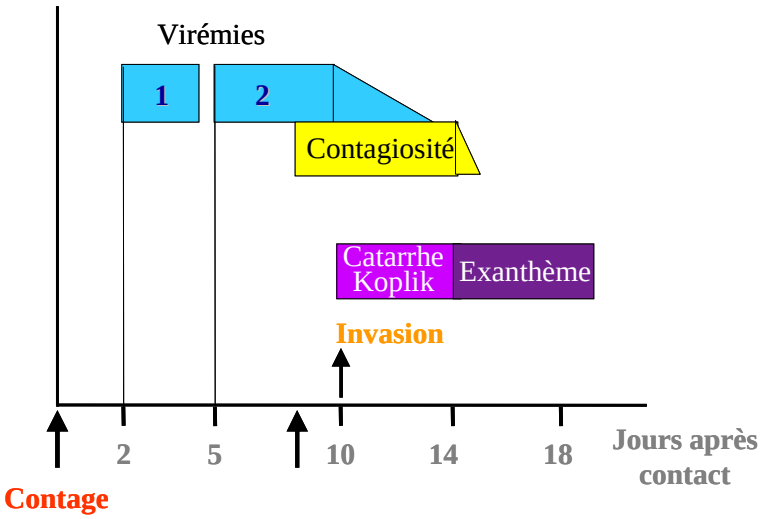


Figure 5. Physiopathologie de l'infection due au virus de la rougeole (d'après P. Lebon, Université René Descartes Paris 5)

La clinique de l'infection est liée au tropisme du virus pour le tissu lymphoïde et l'endothélium vasculaire. La leucopénie précoce est secondaire à la destruction de cellules lymphomonocytaires par le virus, notamment au niveau du cortex thymique, s'exprimant par une déplétion importante en lymphocytes thymo-dépendants dans la rate, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer. Le signe de Koplick et l'exanthème sont dus à une vascularite suite à une réaction d'hypersensibilité aux antigènes viraux et à la réponse T-cellulaire au niveau des cellules endothéliales. Ce symptôme n'est d'ailleurs pas observé chez les enfants immunodéprimés.

II.6.2 Rôle des protéines V et C

Les protéines V et C, codées par le gène P, sont généralement considérées comme des protéines non structurales, mais des travaux récents indiquent que la protéine C est présente dans le virion [Devaux & Cattaneo, 2004]. Les protéines C et V de nombreux *Paramyxoviridae* possèdent une activité antagoniste de l'interféron. Ainsi, la protéine V du virus de la rougeole bloque le signal de transduction en réponse à l'interféron alpha ou bêta et la protéine C présente également une inhibition du signal interféron.

Les protéines C et V jouent donc un rôle important dans la réplication du virus *in vivo* et dans la pathogénicité du virus. Les études les plus récentes ont montré que la protéine V est nécessaire pour l'invasion rapide du tissu muqueux et des organes lymphoïdes, tandis que la protéine C joue un rôle dans des phases plus tardives de l'infection, ce qui fait de ces deux protéines des éléments non pas accessoires mais indispensables à la pathogenèse rougeoleuse [von Messling et al., 2006].

II.6.3 Persistance et neurovirulence

Des études épidémiologiques ont prouvé que les patients présentant une PESS avaient été infectés très jeunes, alors que leur système immunitaire était encore immature et en l'absence d'anticorps maternels à un taux suffisant pour neutraliser le virus. Donc, une réponse immunitaire inefficace peut être à l'origine de l'établissement d'une infection persistante. Cette hypothèse a été confirmée sur un modèle animal de souriceaux inoculés par voie intracérébrale chez qui la présence d'anticorps maternels ou acquis favorisait le développement d'une infection persistante [Schneider-Schaulies et al., 2003].

Le virus retrouvé dans le tissu cérébral des patients atteints de PESS est neutralisé par les anticorps anti-rougeole, mais son génome ARN est plus grand que celui du virus de la rougeole de 10% et la protéine M a une mobilité électrophorétique modifiée [Neighbour et al., 1978]. Des études immunochimiques ont révélé la présence de mutations dans les séquences codantes pour les protéines d'enveloppe du virus de la rougeole et une réduction de leur expression dans le cerveau des patients atteints de PESS ou d'encéphalite à inclusion, ainsi que l'expression des gènes correspondants, alors que la réplication du complexe nucléoprotéique est apparemment maintenue [Cattaneo et al., 1988].

Cette diminution de l'expression des protéines virales de l'enveloppe, caractéristique de la PESS, fait suite à des modifications mutationnelles, transcriptionnelles et translationnelles. Des mutations s'accumulent dans le génome viral, notamment au niveau des gènes F et M, et la transcription des gènes de l'enveloppe est diminuée, modifiant ainsi le gradient de transcription. Par exemple, des études de séquence ont ainsi montré dans les souches neuro-adaptées du virus de la rougeole, produites par passages successifs dans le cerveau de modèles animaux, que les mutations s'accumulaient dans le gène H, dans la région d'un déterminant antigénique majeur, entraînant possiblement l'apparition de la neurovirulence par modification du récepteur [Moeller et al., 2001]. Ainsi la recombinaison d'un virus de la souche Edmonston avec le gène de la protéine H de la souche CAM/RB permet le transfert de neurovirulence [Duprex et al., 1999].

Des déterminants additionnels de la neurovirulence sont codés dans d'autres régions du génome du virus de la rougeole. Ainsi la présence des cinq protéines structurales du virus de la rougeole (N, M, P, H, F) diffère entre les échantillons de cerveaux de différents patients atteints de PESS (présence continue de N et P, absence selon les cas de F et/ou M et/ou H), et même entre les différentes zones d'un même cerveau de patient atteint de PESS [Liebert et al., 1986]. Toutefois le remplacement du gène H seul est suffisant pour entraîner la neuropathologie.

Globalement, la réponse interféron, et notamment l'absence de réponse interféron dans les neurones, un gradient d'expression virale exagéré, l'accumulation d'hypermutations dans les gènes de l'enveloppe, la modulation antigénique induite par les anticorps et la diffusion cellule à cellule de la nucléocapside sont à l'origine de l'infection persistante du cerveau et de l'incapacité de l'organisme à éliminer le virus [Schneider-Schaulies et al., 2003].

La souche neurovirulente CAM/RB :

L'Université d'Osaka au Japon a été la première à disposer de la souche CAM, d'origine japonaise [Murakami et al., 1998]. Cette souche a été étudiée pour produire une souche vaccinale (CAM-70), par culture sur œuf de poule embryonné [Minagawa et al., 1976]. La souche CAM/RB (RB pour *rat brain*) a été produite par inoculation dans le cerveau de rats nouveaux-nés, et sélectionnée pour sa neurovirulence [Moeller et al., 2001].

Les souches de virus de la rougeole adaptées aux rongeurs se répliquent dans le cerveau des animaux nouveau-nés et induisent une encéphalite rougeoleuse aiguë fatale, alors que, au bout de une à quatre semaines selon la souche de souris, le système immunitaire devient mature et l'animal perd sa susceptibilité au virus [Schubert et al., 2006]. Les souris CBA présentent une forte susceptibilité à l'encéphalite due au virus de la rougeole, probablement en raison d'une faible réponse des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ [Niewiesk et al., 1993]. Chez des souriceaux nouveaux-nés inoculés par la souche CAM/RB, le virus infecte les neurones et cause une encéphalite aiguë létale. Chez des souris âgées de deux semaines, l'infection intracérébrale devient subclinique, une infection locale persiste dans des groupes de neurones. Sept à 28 jours après l'inoculation, 86 et 81% des souris sont respectivement infectées, et le virus persiste plus de 50 jours après l'inoculation [Schubert et al., 2006].

Des souris transgéniques exprimant CD46, l'un des récepteurs du virus de la rougeole, ont également été utilisées pour induire une encéphalite due au virus de la rougeole, mais le développement de l'encéphalite aiguë chez des rats non sevrés inoculés par la souche CAM/RB ou chez des souris avec la souche HNT (*hamster neurotropic*) ne nécessite pas l'expression du récepteur CD46 [Moeller et al., 2001].

II.7 CLINIQUE

II.7.1 Rougeole commune

L'incubation dure dix jours en moyenne mais sa durée peut être raccourcie chez le nourrisson ou en cas de contamination massive, ou allongée chez l'adulte ou un patient immunisé (trois semaines). Le premier signe clinique est un catarrhe oculo-naso-bronchique fébrile, l'éruption apparaît trois à quatre jours plus tard. Elle est précédée du signe de Koplik (énanthème de la face interne des joues). L'exanthème débute au pourtour du cuir chevelu et au visage, puis s'étend au thorax et à l'abdomen. Il est constitué d'éléments rouge vif,

irrégulièrement arrondis, ayant un certain relief (maculo-papuleux) et dure environ une semaine. Il peut être inapparent chez les personnes immunodéprimées [Freymuth, 2003].

Les complications sont à l'origine de la gravité de la maladie. Le taux de complications varie en fonction de l'âge, de la région géographique et de l'éruption. Elles sont augmentées par les déficits immunitaires, la malnutrition, les déficits en vitamine A et une exposition importante à la rougeole au décours de contacts inter-familiaux. La mortalité est plus élevée chez les enfants âgés de moins de douze mois et plus basse entre un et neuf ans. Le taux de complications et la mortalité augmentent à l'âge adulte [Asaria & MacMahon, 2006].

II.7.2 Complications neurologiques

Au cours des cas de rougeole commune, peuvent apparaître une hypercytose du LCR dans 10% des cas et des anomalies de l'électro-encéphalogramme dans 50% des cas.

Les encéphalites caractérisées sont rares mais d'évolution dramatique.

II.7.2.1 Encéphalomyélite aiguë post-infectieuse

L'encéphalite aiguë post-infectieuse se développe dans environ 0,1% des infections dues au virus de la rougeole, soit en moyenne quatre cas/an en France [Mailles, 2005]. Le taux de mortalité varie de 10 à 20% et des séquelles neurologiques graves surviennent dans 20% des cas. L'encéphalite aiguë post-infectieuse débute cinq à sept jours après l'éruption, avec réapparition de la fièvre, convulsions, troubles de la conscience et signes neurologiques localisés. La présence de très faibles quantités d'acide nucléique dans le LCR laisse penser que l'encéphalite est due à un mécanisme immunopathologique [Schneider-Schaulies et al., 2003].

Il est également important de noter l'absence de synthèse intrathécale d'anticorps anti-rougeole et la présence d'une hyperprotéinorachie modérée et d'une glycorachie normale du LCR [Asaria & MacMahon, 2006].

II.7.2.2 Panencéphalite subaiguë sclérosante

C'est une complication beaucoup plus rare ($1/10^6$ cas). Contrairement aux encéphalites post-infectieuses, le virus de la rougeole est présent en grande quantité dans les cellules du cerveau de patients présentant une PESS. La PESS se développe chez des patients immunocompétents, en présence de titres élevés d'anticorps dans le sérum et le LCR, et se

développe après une période sans signe clinique de plusieurs années. Cette encéphalopathie dégénérative, toujours mortelle, apparaît un à quinze ans après la rougeole commune. Elle est secondaire à la réplication persistante d'un virus sélectionné comme étant défectif au niveau des gènes codant pour la protéine M et d'autres composants de l'enveloppe. La réplication virale a lieu dans le cortex et la substance blanche d'où le nom de panencéphalite subaiguë sclérosante [Schneider-Schaulies et al., 2003].

II.7.2.3 Encéphalite aiguë progressive

Aussi appelée encéphalite aiguë à inclusion, elle est secondaire à une réplication virale cytolytique dans le tissu cérébral, non limitée par la réponse immunitaire, chez les patients immunodéprimés. Survenant un à six mois après la rougeole, l'évolution est fatale le plus souvent ou se stabilise dans un état neurologique très dégradé.

II.7.3 Autres complications

II.7.3.1 Complications respiratoires

La pneumonie est une des complications fatales les plus fréquentes puisqu'elle est reconnue responsable de 56 à 86% des cas de décès dus à la rougeole. Cette complication est présente dans 2 à 27% des cas dans les pays développés, et chez 16 à 77% des enfants hospitalisés pour une infection rougeoleuse. Elle peut être due à l'effet direct du virus sur l'épithélium respiratoire des voies basses, mais plus de 50% des pneumonies secondaires à la rougeole sont dues à une surinfection bactérienne, notamment à *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, ou à des bacilles gram négatifs entériques. Ces surinfections bactériennes, secondaires à l'effet immunosuppresseur de l'infection rougeoleuse, sont responsables du fort taux de mortalité observé au cours des pneumonies rougeoleuses. Le rôle des co-infections virales est moins établi, cependant la présence d'adénovirus ou de HSV a déjà été démontrée [Duke & Mgone, 2003].

II.7.3.2 Complications gastro-intestinales

Les épisodes diarrhéiques au cours de la rougeole peuvent également être associés à une infection secondaire bactérienne ou parasitaire, aggravant un déficit nutritionnel dans des populations de malnutris. Des hépatites cliniques et des hypocalcémies asymptomatiques peuvent se produire et sont observées plus fréquemment chez les adultes que chez les enfants [Shalev-Zimels et al., 1988].

II.7.3.3 Rougeole et déficit en vitamine A

Les concentrations sériques en rétinol sont diminuées au cours d'une infection rougeoleuse aiguë, même chez les enfants ne présentant pas un état de dénutrition. Cette hyporétinolémie peut s'expliquer soit par un défaut de stockage hépatique soit par une mobilisation trop lente de la vitamine A à partir de stocks hépatiques suffisants. Le degré de déficit en rétinol est associé à la gravité de la maladie : la vitamine A est essentielle à l'intégrité des tissus épithéliaux de l'organisme et un déficit en vitamine A entraîne une diminution des défenses immunitaires. Le virus de la rougeole a des effets similaires sur les épithéliums et l'immunité, ce qui explique la gravité des symptômes de l'infection virale au cours d'un déficit en vitamine A. Ainsi, un déficit en vitamine A augmente la gravité de l'infection par le virus de la rougeole et/ou le risque d'infections secondaires virales ou bactériennes [Huiming et al., 2005].

Dans les pays en voie de développement, le déficit en vitamine A, ainsi que le jeune âge et la malnutrition, sont des facteurs de risque de complications au cours de la rougeole. Il a été démontré que l'administration de vitamine A est associée à une diminution de la mortalité et notamment de la mortalité secondaire aux complications pulmonaires, chez les enfants de moins de deux ans recevant deux doses de traitement de 200 000 UI chacune. L'OMS recommande donc l'administration orale d'une dose de vitamine A, chaque jour et pendant deux jours, aux enfants ayant la rougeole et vivant dans des pays où préexiste un déficit en vitamine A [Halsey, 2006].

II.7.3.4 Dépression immunitaire et rougeole

L'infection par le virus de la rougeole induit un déficit immunitaire transitoire. Le nombre de cellules T circulantes est diminué et des cas de leucopénie importante sont souvent décrits au cours d'infections aiguës. La production d'anticorps et la réponse immunitaire cellulaire aux antigènes sont réduites et les réactions d'hypersensibilité retardée sont inhibées. Les enfants de moins de un an et les adultes présentent une normalisation retardée de la lymphopénie. L'immunodéficience persiste plusieurs semaines après que le nombre de lymphocytes soit revenu à la normal (Figure 6), et est probablement responsable de l'important taux de mortalité dû à la rougeole dans le monde [Schneider-Schaulies & ter Meulen, 2002].

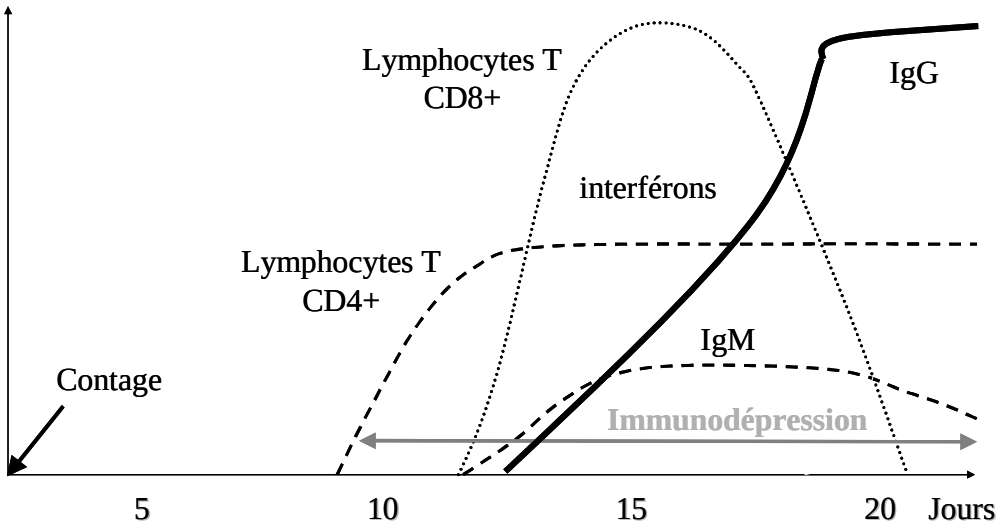


Figure 6. Réponse immunitaire et immunodépression (d'après P. Lebon, Université René Descartes Paris 5)

II.8 TRAITEMENTS

II.8.1 Curatif

Différents essais cliniques ont été réalisés pour tester l'efficacité de la ribavirine, des immunoglobulines et de l'interféron sur la rougeole. L'interféron alpha seul n'est pas efficace. La ribavirine et les immunoglobulines semblent diminuer la détresse respiratoire. Des données contradictoires ont été rapportées concernant l'utilisation de ribavirine seule par voie

orale, intraveineuse, ou en aérosol. Dans le traitement de la PESS, l'administration intrathécale d'interféron associé à l'administration de ribavirine à un stade précoce de la maladie a montré un certain bénéfice [Barnard, 2004]. La ribavirine peut être proposée par voie intraveineuse au cours de pneumopathies interstitielles sévères [Forni et al., 1994].

Un traitement symptomatique peut être instauré pour limiter la fièvre et la toux [Freymuth, 2003].

II.8.2 Préventif

L'injection d'immunoglobulines standard peut prévenir l'apparition de la rougeole si elles sont injectées dans les quatre à cinq jours suivant le contage. Ce traitement peut concerner les sujets non immuns, fragiles ou immunodéprimés [Desjardin & Snydman, 1998].

La vaccination repose sur un vaccin vivant atténué, issu de la souche Edmonston. Elle est généralement pratiquée associée à la vaccination contre les oreillons et la rubéole (vaccin Rougeole Oreillons Rrubéole ou ROR). Selon le calendrier vaccinal, la première injection a lieu à l'âge de 12 mois et le rappel entre 13 et 24 mois, avec un délai minimal de un mois entre les deux injections. Les enfants peuvent être vaccinés par un vaccin trivalent dès l'âge de neuf mois (recommandé en cas d'entrée en collectivité) [Invs, 2008].

Le virus de la rougeole est responsable d'une pathologie infantile bénigne qui peut se compliquer à plus au moins long terme par une infection du système nerveux central. Aucune molécule thérapeutique n'est actuellement validée pour le traitement préventif ou curatif de la rougeole et de ses complications, mais il a été démontré que l'injection de ribavirine par voie intraveineuse pouvait apporter un bénéfice aux patients présentant des infections graves dues au virus de la rougeole [Forni et al., 1994]. L'activité antivirale de la ribavirine contre le virus de la rougeole a également été démontrée dans différents modèles animaux, par différentes voies d'administration [Honda et al., 1994; Wyde et al., 2000].

III. RIBAVIRINE

III.1 GENERALITES

Synthétisée en 1972 par l'équipe de Sidwell [Sidwell et al., 1972], la ribavirine [1-(β-D-ribofuranosyl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide] est un analogue nucléosidique de la guanosine possédant une masse moléculaire de 244,2 g/mol. Elle se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche, ou presque blanche, à stocker à l'abri de la lumière à +4°C. Elle est soluble dans l'eau, légèrement soluble dans l'éthanol (96% v/v) et peu soluble voire très peu soluble dans le chlorure de méthylène.

La structure chimique de la ribavirine (Figure 7) comporte un ribose et un noyau triazole. Ce dernier se rapproche du noyau imidazole des bases puriques et du noyau des bases pyrimidiques.

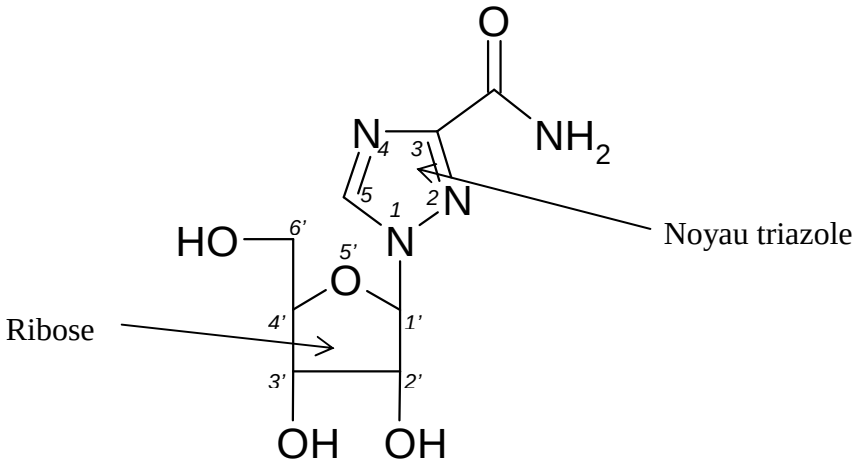


Figure 7. Structure de la ribavirine [1-(β-D-ribofuranosyl)-1H-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide]

La ribavirine est commercialisée sous différentes formes (orale, parentérale ou inhalée) par différents laboratoires pharmaceutiques (Tableau 3).

Tableau 3. Formes commercialisées de ribavirine : renseignements généraux et galéniques (d'après http://www.Theriaque.org)

Forme	Orale	Orale	Parentérale	Inhalée
DCI	Ribavirine	Ribavirine	Ribavirine	Ribavirine
Nom déposé	Rebetol®	Copegus®	Virazol®	Virazol®
Classe thérapeutique	Antiviral systémique	Antiviral systémique	Antiviral systémique	Antiviral systémique
Laboratoire	Schering Plough	Roche	ICN Pharmaceuticals	ICN Pharmaceuticals
Disponibilité	Ville et Hôpital	Ville et Hôpital	Hôpital	Hôpital
Forme galénique	Gélule à (200 mg) Solution buvable (4 g/100 ml)	Comprimé 200 mg et 400 mg	Solution injectable 1,2 g/12 ml	Poudre pour solution pour inhalation 6 g/100 ml
Conservation	< 30°C	Température ambiante	NR	NR
Statut	AMM	AMM	ATU	ATU

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

NR : Non renseigné

III.2 CIBLES VIRALES

La ribavirine possède un large spectre d'activité contre les virus à ARN et à ADN, puisqu'il a été démontré dès 1972 qu'elle était capable d'inhiber l'effet cytopathique en culture cellulaire de l'adénovirus de type 3, des HSV-1 et 2, du CMV, du virus de la vaccine, des rhinovirus de type 1A, 2, 8, 143 et 56, du virus de la stomatite vésiculaire, des para-influenzavirus de type 1 et 3 , du virus Semliki Forest, du virus de la maladie de Newcastle et du virus de la rougeole. Son action sur une culture d'oeuf de poule embryonné se traduit par une diminution du titre en hémagglutinine des influenzavirus A et B, et du para-influenzavirus de type 1 [Huffman et al., 1973; Sidwell et al., 1973].

Son activité a ensuite été confirmée sur d'autres virus à ARN ou à ADN (Tableau 4).

En dépit des nombreuses cibles potentielles de la ribavirine, son autorisation de mise sur le marché se limite à l'heure actuelle au traitement de l'hépatite C chronique en association avec l'interféron. Elle est toutefois utilisée en clinique dans le cas d'infections sévères dues au VRS [Schleuning et al., 2004] et à certains virus des fièvres hémorragiques dont le virus de Lassa [Haas et al., 2003].

Tableau 4. Activité antivirale *in vitro* ou *in vivo* de la ribavirine sur les virus responsables d'infections du système nerveux central chez l'Homme

Virus		Sensibilité à la ribavirine		Références
Virus à ADN				
Adenoviridae	Adénovirus	Controversée Sérotype dépendant	*In vitro*	[Lenaerts & Naesens, 2006; Naesens et al., 2005; Stock et al., 2006]
Herpesviridae	Virus herpes simplex	Non	*In vivo*	[Alenius, 1980]
	Virus varicelle-zona	NR		Ø
	Cytomégalovirus	Non	NR	[Verheyden, 1988]
	Herpesvirus humain 6	Non	*In vitro*	[Naesens et al., 2006]
	Epstein Barr virus	NR		Ø
Polyomaviridae	JC Virus (LEMP)	Non	*In vivo*	[Andrei et al., 1997]
Poxviridae	Vaccine	Oui	*In vivo*	[De Clercq et al., 1976]
Virus à ARN				
Bunyaviridae	Fièvre de la vallée du Rift	Oui	*In vivo*	[Canonico et al., 1984]
Flaviviridae	Encéphalite japonaise	Oui	*In vitro*	[Crance et al., 2003]
	Encéphalite de Saint Louis	NR		Ø
	Encéphalite à tique	Oui	*In vitro*	[Crance et al., 2003]

	West Nile Virus	Oui	*In vitro*	[Day et al., 2005]
Orthomyxoviridae	Grippe	Partielle	Clinique	[Magnussen et al., 1977]
Paramyxoviridae	Hendra	Oui	*In vitro*	[Wright et al., 2005]
	Nipah	Discutée	Clinique	[Snell, 2004]
	Oreillons	Oui	*In vitro*	[McCammon & Riesser, 1979]
	Rougeole	Oui	*In vitro*	[Sidwell et al., 1972]
	Rougeole (PESS)	Oui	*In vivo*	[Honda et al., 1994]
Picornaviridae	Entérovirus (poliovirus, Coxsackie)	Oui	*In vitro*	[Crotty et al., 2000; Kishimoto et al., 1988]
Retroviridae	VIH	Discutée	*In vitro*	[Hirsch & Kaplan, 1987]
Rhabdoviridae	Rage	Non	*In vivo*	[Bussereau et al., 1988]
Togaviridae	Rubéole	NR		Ø

III.3 MECANISME D'ACTION

Plus de 30 ans après sa découverte, le mécanisme d'action de la ribavirine reste controversé. Un certain nombre de mécanismes distincts ont été suggérés, dépendants des caractéristiques du virus testé. Généralement, il y a cinq mécanismes d'action principaux proposés pour la ribavirine. Les mécanismes indirects incluent la réduction du pool intracellulaire de guanosine triphosphate (GTP) *via* l'inhibition de l'inosine monophosphate déhydrogenase (IMPDH), et un effet immunomodulateur dans lequel la réponse immunitaire T-helper de type 1 (antivirale) est maintenue. Les mécanismes directs incluent l'inhibition de l'activité de coiffage des ARN, l'inhibition directe de la polymérase virale et l'augmentation de la fréquence des mutations *via* l'incorporation de la ribavirine dans les génomes nouvellement synthétisés, entraînant des erreurs [Graci & Cameron, 2006].

III.3.1 Inhibition de l'inosine monophosphate déhydrogénase

La première et seule étape dans la synthèse cellulaire *de novo* de la guanine est catalysée par une enzyme, l'IMPDH. La réaction est NAD-dépendante et convertit l'inosine monophosphate (IMP) en xanthosine monophosphate (XMP). La XMP peut ainsi être aminée en guanosine monophosphate (GMP) par une enzyme, la guanosine monophosphate synthase. La GMP est ensuite convertie en métabolites de la guanine tels que la guanosine triphosphate et la désoxyguanosine triphosphate (dGTP), qui sont essentiels en temps que précurseurs pour la synthèse de l'ARN et de l'ADN, respectivement (Figure 8). De plus, la GTP joue un rôle important dans le stockage de l'énergie, le signalement intracellulaire, la traduction par les ribosomes et la synthèse des glycoprotéines [Graci & Cameron, 2006].

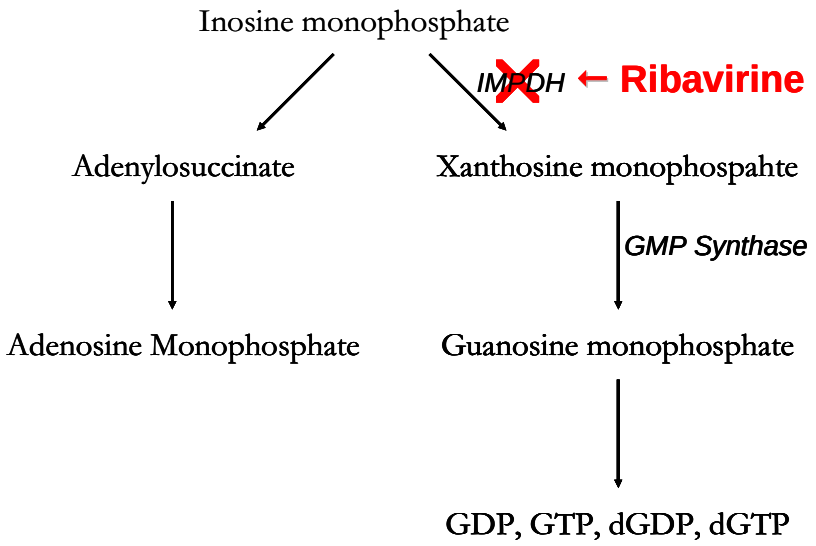


Figure 8. Inhibition de l'inosine monophosphate déhydrogénase par la ribavirine (d'après Graci et al., 2006)

En raison de ses similitudes structurales avec la GMP, la ribavirine est un inhibiteur compétitif potentiel de l'IMPDH. La GTP et la dGTP sont essentielles pour la traduction, la transcription et la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Donc, la diminution de la GTP disponible peut potentiellement inhiber ces étapes du cycle de réplication virale et expliquer en partie l'action antivirale de la ribavirine.

III.3.2 Immunomodulation

Il a aussi été proposé que la ribavirine agisse selon un mécanisme antiviral indirect, en favorisant la réponse immunitaire T. La ribavirine entraînerait un switch phénotypique des cellules T-auxiliaires, du type 2 au type 1. La réponse T-cellulaire de type 1 est associée à l'immunité cellulaire et à l'expression de l'interleukine IL-2, de l'interféron gamma et du TNF (*Tumor Necrosis Factor*). La réponse lymphocytes T-auxiliaires de type 2 favorise l'immunité humorale et est associée avec l'expression de IL-4, IL-5 et IL-10. Il a été suggéré qu'une réponse immunitaire de l'hôte inefficace est un facteur important dans le développement des infections chroniques et notamment, une réponse T-auxiliaires de type 2 a été associée au développement de maladie chronique au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C [Graci & Cameron, 2006].

Cette propriété pourrait rendre compte en partie de l'activité antivirale de la ribavirine même si son mécanisme n'est pas, à ce jour, élucidé.

III.3.3 Inhibition du "coiffage" des ARN

L'extrémité 5' de la plupart des ARN cellulaires et de certains des ARN viraux contient une structure composée de 7 méthyl-guanosine, appelée coiffe. Cette structure est essentielle pour la stabilité de l'ARN et pour la traduction. En tant qu'analogue de guanosine, la ribavirine a la capacité d'interagir avec les enzymes responsables du "coiffage" des ARN cellulaires et viraux. Généralement, la coiffe est synthétisée par l'intermédiaire de trois réactions enzymatiques : une ARN phosphatase clive le triphosphate en 5' de l'ARN en diphosphate, puis une ARN guanylyltransférase catalyse l'addition d'une GMP à l'extrémité 5' et l'ARN (guanine-7-) méthyltransferase catalyse l'addition d'un groupement méthyle à partir d'une S-adénosyl-méthionine sur la guanine terminale, en position N-7 (Figure 9).

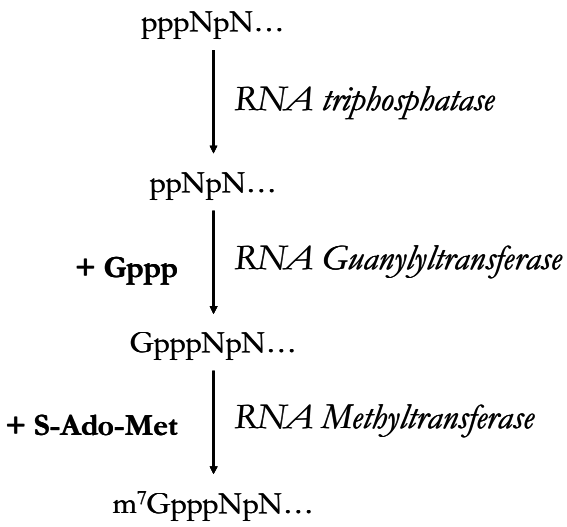


Figure 9. Mécanisme du coiffage des ARN en 5' (d'après Graci et al., 2006)

Certains virus utilisent une structure de coiffe en 7-méthylguanosine à l'extrémité 5' de l'ARN génomique. Comme le coiffage des ARNm des eucaryotes a lieu dans le noyau, les enzymes codées par le virus sont nécessaires pour catalyser la réaction de coiffage des virus se répliquant dans le cytoplasme. En tant qu'analogue de guanosine, la ribavirine aurait la capacité d'inhiber les enzymes virales impliquées dans ce processus : la ribavirine exercerait son activité antivirale en interagissant avec le mécanisme de "coiffage" de l'ARN, soit en inhibant les enzymes impliquées dans l'ajout de la coiffe en 7-méthylguanosine à l'ARN soit par l'incorporation de ribavirine à la coiffe en 5'. Ces mécanismes peuvent fonctionner avec les virus utilisant des transcipts ou des génomes coiffés, mais ne permet pas d'expliquer

l'activité à large spectre de la ribavirine car de nombreux virus sensibles à la ribavirine n'utilisent pas de structure coiffée au cours de l'infection [Graci & Cameron, 2006].

III.3.4 Inhibition de la polymérase

Le principal métabolite intracellulaire de la ribavirine est la ribavirine tri-phosphate (RTP). L'inhibition de la synthèse des acides nucléiques par la ribavirine pourrait être due à l'interaction entre la RTP et la polymérase virale. En effet, la RTP accumulée dans les cellules entrerait en compétition avec les pools cellulaires de GTP et ATP. De plus, au cours de différentes études, ni la ribavirine, ni la ribavirine mono-phosphate n'ont présenté d'activité inhibitrice [Graci & Cameron, 2006].

Des interactions contradictoires ont été prouvées pour les réovirus, le virus de l'hépatite C (VHC) ou le VIH.

III.3.5 Induction de mutations létales dans le génome des virus à ARN

De nombreuses hypothèses ont été établies pour justifier l'activité antivirale de la ribavirine par une incorporation du nucléotide dans l'ARN par des polymérases cellulaires et virales, suite à l'identification de la RTP comme étant le métabolite principal de la ribavirine. La preuve de l'incorporation de la ribavirine dans l'ARN au cours de la réplication virale a été apportée par l'équipe de Crotty [Crotty et al., 2000]. Ils ont pu démontrer que la ribavirine est incorporée lentement dans l'ARN, à un taux concordant avec celui d'un nucléotide inadapté, ce qui correspond à une moyenne de une ou deux molécules incorporées pour un génome ARN de 7500 nucléotides. De plus ils ont révélé la capacité de la ribavirine à se lier indifféremment avec la cytidine ou à l'uridine. Ainsi la ribavirine entraîne une ambiguïté dans l'appariement des bases. Cette capacité est liée à la rotation du groupement carboxamide de la pseudo-base, générant un pont hydrogène avec l'une ou l'autre des deux bases pyrimidiques (Figure 10).

Si la ribavirine est un analogue ambigu des bases puriques, elle est également un agent mutagène pour les ARN au sein desquels elle est incorporée. Les études *in vitro* suggèrent que la ribavirine induit des transitions A ➔ G et C ➔ U.

Les virus à ARN ont une fréquence de mutation très élevée (10^{-5} à 10^{-3} par cycle de réplication), due à l'absence d'activité réparatrice de la polymérase. Les virus à ARN existent

donc sous forme de quasi-espèces, c'est-à-dire une population hétérogène, dont la séquence diffère légèrement de la séquence prédominante. La variabilité du génome présente dans ces populations représente un bénéfice en matière d'adaptation aux modifications de l'environnement, et notamment le tropisme, l'immunité ou la thérapie antivirale. Toutefois la théorie des quasi-espèces prédit l'existence d'un seuil limite à la variabilité génomique, au-delà duquel les mutations additionnelles se révèleraient délétères pour la population. Le terme de mutagenèse létale a été inventé pour décrire une stratégie antivirale dans laquelle la population virale serait forcée au-delà de ce seuil d'erreur. Ce mécanisme a été décrit pour la ribavirine chez le poliovirus, le VHC, les virus Hantaan et West Nile [Crotty & Andino, 2002].

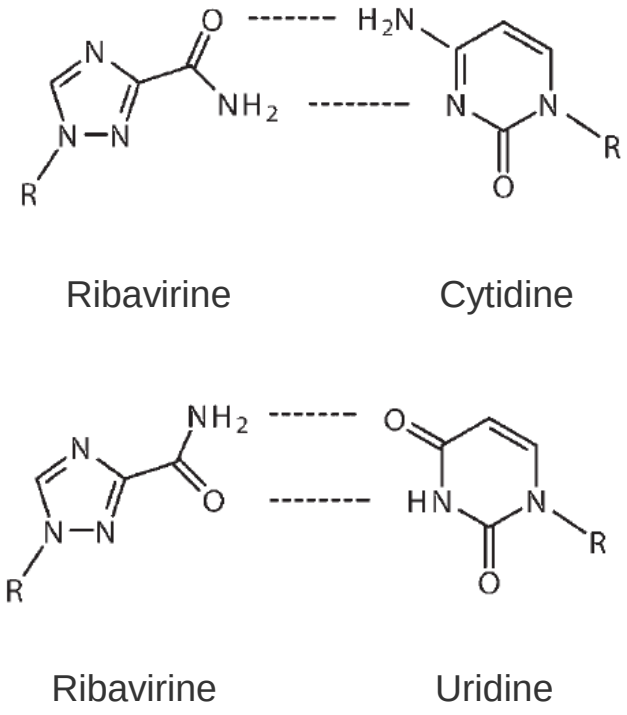


Figure 10. Mésappariement de la ribavirine avec les bases puriques, à l'origine des phénomènes de mutagenèse létale (d'après Graci et al., 2006)

III.4 PHARMACOLOGIE DE LA RIBAVIRINE

Après son entrée dans la cellule, la ribavirine est successivement convertie en ribavirine-5'monophosphate, ribavirine-5'diphosphate puis en ribavirine 5'tri-phosphate suite à l'action de kinases cellulaires. Le métabolisme *in vivo* de la ribavirine conduit donc à l'accumulation de ribavirine-5'triphosphate.

III.4.1 Métabolisme et effets cellulaires de la ribavirine

En clinique, la ribavirine est utilisée sous forme de nucléoside. L'adénosine kinase est l'enzyme cellulaire responsable de sa conversion en ribavirine monophosphate (RMP). Les cellules déficientes en adénosine kinase accumulent seulement de petites quantités de ribavirine monophosphate. Des phosphorylations successives de la RMP produisent des nucléotides di- et tri-phosphorylés. Bien que les concentrations relatives de ribavirine mono-, di- et tri-phosphorylée varient en fonction du type cellulaire, la ribavirine tri-phosphate est généralement le métabolite prédominant. Le métabolisme de la ribavirine est spécifique du type cellulaire. La demi-vie des métabolites est relativement courte en culture cellulaire de fibroblastes et lymphoblastes, mais les nucléotides sont plus stables dans les érythrocytes. Cette accumulation de la ribavirine dans les érythrocytes est responsable de l'anémie hémolytique réversible qui est un des effets secondaires du traitement. La ribavirine a des effets importants sur la cellule traitée. C'est un agent cytostatique et elle entraîne une diminution de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines dans les cellules exposées [Glue, 1999].

III.4.2 Administration par voie orale

La biodisponibilité orale de la ribavirine est comprise entre 32 et 45%. Après administration par voie orale, la ribavirine est absorbée au niveau du grêle proximal grâce à des transporteurs du sodium; le temps moyen pour atteindre la concentration maximale est de une heure et demie. Ensuite survient une phase de distribution rapide et une phase d'élimination prolongée. Après administrations multiples, la ribavirine s'accumule dans le plasma. A dose thérapeutique (600 mg x 2/jour), l'état d'équilibre est atteint après quatre semaines avec des concentrations plasmatiques comprises entre 1300 et 2500 ng/ml. La demi-vie plasmatique est comprise entre 20 et 60 heures. La ribavirine est ensuite transportée

au niveau de toutes les cellules humaines puis phosphorylée. Le transport vers le milieu extracellulaire nécessite une déphosphorylation de la ribavirine. Cette propriété est déficiente au niveau érythrocytaire, ce qui explique le défaut de déphosphorylation de la molécule et donc son accumulation dans les globules rouges sous forme triphosphatée. La concentration intra-érythrocytaire en ribavirine est 60 fois supérieure à sa concentration plasmatique; sa demi-vie au niveau intra-érythrocytaire est de 40 jours. Son élimination s'effectue *via* l'hémolyse splénique [Duclos-vallée & Samuel, 2001].

La ribavirine n'est pas liée aux protéines plasmatiques, sa métabolisation est hépatique et elle est excrétée par voie rénale, ses métabolites également.

III.4.3 Administration par voie parentérale

Au cours d'une étude réalisée chez six volontaires sains recevant 150 mg par voie intraveineuse, puis, 1h après, 400 mg par voie orale de ribavirine marquée avec un isotope stable du carbone ($^{13}C_3$-ribavirine), la concentration maximale dans le plasma atteignait 4 187 ± 199,4 ng/ml et 26,7% de la dose administrée était excrétée dans les urines sous forme inchangée [Preston et al., 1999].

III.5 TOXICITE

L'utilisation de la ribavirine par voie orale ou parentérale entraîne deux effets indésirables principaux et graves, l'anémie hémolytique et la tératogénicité.

III.5.1 Anémie hémolytique

L'utilisation de la ribavirine entraîne un risque d'anémie, par accumulation intra-érythrocytaire de la ribavirine. L'absence de phosphatase dans les érythrocytes freine la déphosphorylation des métabolites de la ribavirine et empêche leur sortie des cellules. Les dérivés phopshorylés de la ribavirine s'accumulent donc avec le temps, atteignant des concentrations nettement supérieures à celles observées dans la circulation sanguine. La libération de la ribavirine s'effectue par hémolyse extravasculaire, entraînant l'anémie hémolytique. Cette complication peut être gravissime chez des patients présentant un terrain cardiovasculaire à risque [Scott & Perry, 2002].

III.5.2 Tératogénicité

Un risque tératogène et/ou embryotoxique significatif de la ribavirine a été démontré chez toutes les espèces animales chez lesquelles des études appropriées ont été menées, et pour des doses aussi faibles que le vingtième de la dose recommandée pour l'Homme. L'incidence et la sévérité des malformations augmentent avec la dose. La toxicité testiculaire a été évaluée par administration de doses de 15 mg/kg chez la souris. Des anomalies du sperme ont été observées dont l'effet est réversible après un ou deux cycles de spermatogénèse [Reichard et al., 1991].

Ainsi l'autorisation de mise sur le marché contre-indique l'initiation d'un traitement chez la femme avant réalisation d'un test de grossesse négatif et au cours de l'allaitement. Les patients de sexe masculin et féminin en âge de procréer ainsi que leur partenaire doivent utiliser chacun des moyens de contraception efficace pendant toute la durée du traitement et pendant quatre à sept mois après son arrêt chez la femme et l'homme respectivement.

III.5.3 Autres effets indésirables

Lors de traitements de courte durée par voie orale, ont pu être observées une toux et une augmentation réversible de la bilirubinémie non conjuguée, du fer sérique et de l'uricémie.

Les aérosols de ribavirine sont bien tolérés mais peuvent engendrer une irritation conjonctivale, une éruption, une dyspnée asthmatiforme transitoire et, de façon occasionnelle, une détérioration progressive de la fonction pulmonaire.

III.6 MOLECULES DERIVEES DE LA RIBAVIRINE

III.6.1 La viramidine

Différentes prodrogues de la ribavirine ont été produites et testées afin d'améliorer sa biodisponibilité et sa tolérance. Une prodrogue est une molécule pharmacologiquement inactive qui sera modifiée *in vivo* afin de libérer la molécule active. Ainsi la viramidine (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) est en cours de développement afin d'améliorer la prise en charge des patients infectés par le virus de l'hépatite C. Cette molécule est clivée en présence d'une enzyme, l'adénosine déaminase, pour donner de la ribavirine (Figure 11). Elle

permet également d'inhiber la nucléoside phosphorylase pour ralentir le catabolisme de la ribavirine et ainsi augmenter la concentration en métabolite phosphorylé actif [Wu et al., 2004]. Cette étape permet une augmentation de la concentration en ribavirine dans le foie et une diminution de sa concentration dans les érythrocytes lorsqu'elle est administrée chez le singe [Lin et al., 2004]. Des études chez l'homme ont montré une bonne absorption de la viramidine par voie orale et une conversion rapide en ribavirine [Lin et al., 2006]. Par ailleurs, la viramidine a la même activité antivirale que la ribavirine contre les virus influenza A saisonniers et H5N1, mais elle est moins toxique. Son efficacité a également été démontrée contre le virus H1N1, chez la souris, après une administration dans l'eau de boisson [Beigel & Bray, 2008].

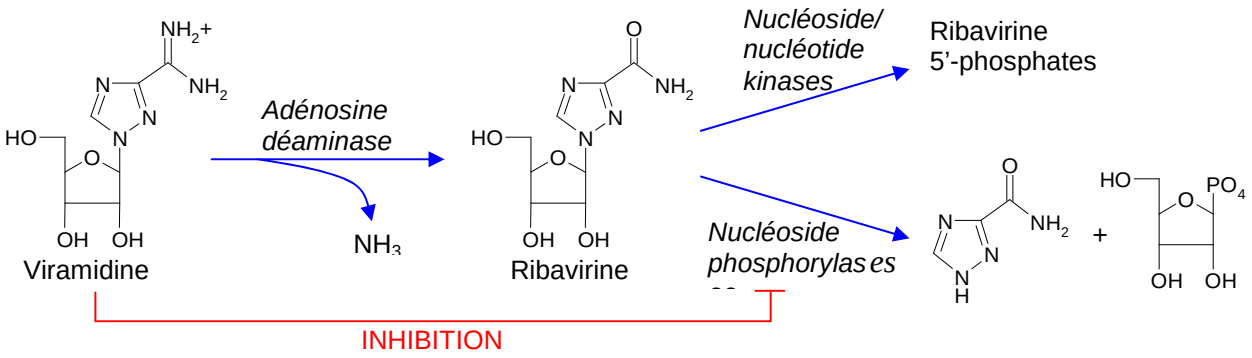


Figure 11. Mécanisme de libération de la ribavirine à partir d'une prodrogue, la viramidine (d'après Wu et al., 2004)

III.6.2 Dérivés estérifiés

L'estérification de la ribavirine a été réalisée dans le but d'augmenter la lipophilie de la molécule et d'améliorer sa distribution dans le SNC avec des résultats variables en fonction de l'ester greffé. Même si la molécule de ribavirine estérifiée est potentiellement capable de traverser la BHE, il n'a pas été démontré d'amélioration de l'activité antivirale par rapport à la ribavirine native au cours du traitement d'encéphalites virales [Bhagrath et al., 1991].

III.6.3 Ciblage hépatique

La ribavirine a également été couplée à la lactosamine-poly-L-lysine, un peptide présentant une terminaison galactosyl qui entre spécifiquement dans les hépatocytes *via* un

récepteur asialoglycoprotéique. Chez la souris, cette combinaison permet d'augmenter la quantité de ribavirine présente dans le foie après une injection intramusculaire [Di Stefano et al., 1997]. Ainsi pour une activité antivirale équivalente, la quantité de ribavirine libre dans le sang circulant serait réduite, entraînant une diminution relative des effets secondaires sur l'hémolyse des globules rouges [Fiume et al., 1998]. Aucune étude n'a été menée chez l'Homme.

III.6.4 La lévovirine

La Lévovirine (1-β-L-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), un L-énantiomère de la ribavirine, a également été étudiée. Elle présente l'avantage de posséder la même activité immunomodulatrice que la ribavirine tout en étant dénuée d'effet toxique hémolytique puisqu'elle n'est pas métabolisée par les kinases cellulaires [Watson, 2002]. En revanche, en l'absence de phosphorylation, elle ne possède pas d'activité antivirale directe due aux métabolites actifs [Fang et al., 2003] et sa biodisponibilité par voie orale est faible en raison d'une absorption limitée dans le tractus digestif [Li et al., 2006]. Son intérêt dans le traitement de l'hépatite C est en cours d'étude.

A l'heure actuelle, aucune de ces molécules n'est utilisée chez l'Homme.

III.7 RIBAVIRINE ET ENCEPHALITES

En clinique, la ribavirine ne dispose d'une autorisation de mise sur le marché que pour l'hépatite C en association avec l'interféron et d'une ATU pour le traitement des infections graves à VRS (Tableau 3). Elle a également été utilisée avec succès dans le traitement de formes compliquées de rougeole à type de pneumopathies [Forni et al., 1994]. En revanche chez les patients atteints de PESS, la ribavirine n'est efficace que lorsqu'elle est administrée par voie intrathécale [Hosoya et al., 2004] ou à forte dose par voie intraveineuse, associée à de l'interféron par voie intrathécale [Hosoya et al., 2001]. Ces quelques descriptions cliniques sont corrélées avec les résultats des études réalisées chez l'animal. Ainsi, même si la ribavirine est efficace *in vitro* sur de nombreux virus responsables d'encéphalites (Tableau 4), son action *in vivo* est très limitée, notamment au cours d'infections du SNC : elle est efficace par aérosol

pour diminuer le titre viral dans les poumons de souris infectées par le virus influenza [Stephen et al., 1976], mais elle est inefficace, quelle que soit la voie d'administration (intramusculaire, intrapéritonéale ou sous-cutanée), sur un modèle animal d'encéphalite herpétique [Sidwell et al., 1973]. De même, chez le hamster, l'activité antivirale de la ribavirine au cours d'une PESS ne s'exprime que si la molécule est administrée par voie intrathécale, contournant le problème de passage de la BHE [Honda et al., 1994]. Cette activité est reliée à une concentration efficace de ribavirine dans le cerveau [Ishii et al., 1996]. La limitation de l'activité antivirale de la ribavirine au cours des encéphalites réside bien dans le passage de la BHE.

La ribavirine est un analogue nucléosidique ayant un large spectre d'activité antivirale. Elle présente une activité antivirale *in vitro* sur de nombreux virus responsables d'infections du SNC. Mais, dans un grand nombre de cas, cette activité antivirale ne s'exprime pas *in vivo* ou uniquement dans des modèles animaux avec une administration de la molécule directement au niveau du SNC. Par ailleurs, la ribavirine diminue la mortalité des patients atteints de panencéphalite subaiguë sclérosante lorsqu'elle est administrée par voie intrathécale, suggérant une incapacité de la ribavirine à franchir la barrière hémato-encéphalique. Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques capables de former des complexes d'association avec la ribavirine [Grancher et al., 2004] en augmentant *in vitro* l'activité antivirale de la ribavirine au sein du complexe [Grancher et al., 2005]. Ces molécules pourraient être utilisées comme vecteur pour améliorer la biodisponibilité de la ribavirine dans le cerveau.

IV. LES CYCLODEXTRINES

IV.1 HISTORIQUE

L'histoire des cyclodextrines se divise en trois périodes. Leur découverte a été publiée en 1891 par un scientifique français, A. Villiers, qui a obtenu par digestion bactérienne de 1000 g d'amidon, 3 g de substance cristalline, nommée alors "cellulosine". Elles seront ensuite nommées crystalline dextrine, puis alpha-dextrine et bêta-dextrine puis dextrines de Schardinger en l'honneur du chercheur qui a décrit leur préparation, leur isolement et leurs principales caractéristiques de 1903 à 1911. La gamma-cyclodextrine a, elle, été découverte en 1935 [Brewster & Loftsson, 2007].

IV.2 GENERALITES

Les cyclodextrines d'intérêt pharmaceutique sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités de dextrose reliées par des liaisons α1-4. Les cyclodextrines comprenant six, sept et huit unités dextrose ont été nommées alpha-, bêta- et gamma- cyclodextrine respectivement (Figure 12).

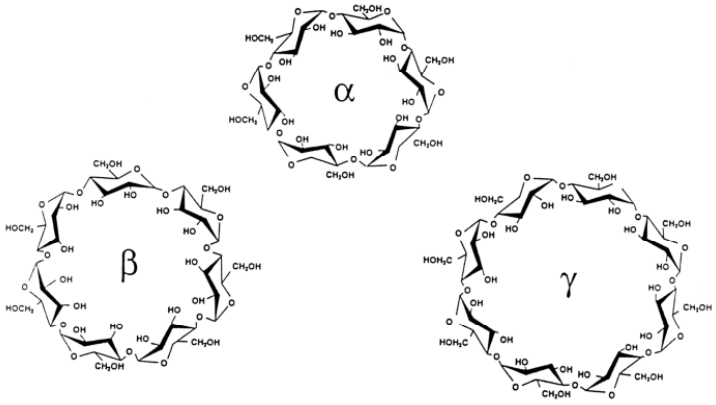


Figure 12. Structure des cyclodextrines natives, alpha, bêta et gamma

La bêta-cyclodextrine et ses dérivés sont probablement les plus utilisés dans les formulations pharmaceutiques, ce sont par conséquent les plus étudiés chez l'Homme. La gamma-cyclodextrine est probablement la moins toxique, au moins parmi les trois principales cyclodextrines natives. Elle est principalement utilisée dans l'industrie alimentaire [Del Valle, 2004].

Les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules. Ces complexes d'inclusion non covalents ont des propriétés physiques, chimiques et biologiques très différentes de celles de la molécule invitée ou de la cyclodextrine. Ces complexes peuvent, par exemple, augmenter la solubilité ou le taux de dissolution, diminuer la volatilité et augmenter la stabilité de la molécule complexée [Loftsson & Brewster, 1996].

IV.3 PRODUCTION DES CYCLODEXTRINES

Le traitement de l'amidon par une amylase d'origine bactérienne *Bacillus macerans* donne un mélange d'alpha-cyclodextrine (≈60%), bêta-cyclodextrine (≈20%) et de gamma-cyclodextrine (≈20%) associé à de petites quantités de cyclodextrines contenant plus de huit unités de glucose. Le mélange obtenu est difficile à purifier et contient souvent d'autres dextrines linéaires ou ramifiées associées à des protéines et d'autres impuretés.

Le développement des biotechnologies a permis la production de cyclodextrine glycosyl transférases plus actives et plus spécifiques pour la production d'alpha-, bêta-, ou gamma-cyclodextrine. L'utilisation de ces enzymes, associée à d'autres innovations technologiques, a conduit à la production de cyclodextrines hautement purifiées, pouvant être utilisées en tant qu'excipients pharmaceutiques [Loftsson & Duchene, 2007].

Pour pallier au défaut de solubilité des cyclodextrines dans l'eau, et notamment de la bêta-cyclodextrine, des cyclodextrines dites de seconde génération ont été synthétisées. Ainsi, la substitution des groupements hydroxyles par des éthers alkyles ou de courtes chaînes hydroxyalkyles augmente l'hydrosolubilité. La production de ces cyclodextrines modifiées conduit à des mélanges amorphes d'isomères. Les dérivés anioniques, de type éther sulfobutyle, présentent un site additionnel d'interaction en modifiant la charge de la cyclodextrine. Par ailleurs, le caractère hémolytique des cyclodextrines natives, et notamment la bêta-cyclodextrine, peut être diminué par la formation de dérivés hydroxypropylés ou sulfobutylés mais est augmenté pour les dérivés méthylés [Defaye et al., 2007].

IV.4 PROPRIETES

Les propriétés physicochimiques des cyclodextrines référencées à la Pharmacopée sont résumées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Solubilités et monographies à la Pharmacopée des cyclodextrines entrant dans la composition de produits pharmaceutiques commercialisés [Loftsson & Duchene, 2007]

Cyclodextrine[a]	Nombre de substituants par unité de glucose	Masse moléculaire (Da)	Solubilité dans l'eau (mg/ml)	Pharmacopées		
				Europe (5éme édition)	USA (28éme édition)	Japon
α-CD	-	972	145	Oui	Non	Oui
β-CD	-	1135	18,5	Oui	Oui	Oui
HPβ-CD	0,65	1400	> 600	Oui	Oui	Non
RMβ-CD	1,8	1312	> 500	Non	Non	Non
SBEβ-CD	0,9	2163	> 500	Non	Non	Non
γ-CD	-	1297	232	En cours	Oui	Oui
HPγ-CD	0,6	1576	> 500	Non	Non	Non

[a] α-CD : α-cyclodextrine; β-CD: β-cyclodextrine; HPβ-CD : 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine; RMβ-CD : β-cyclodextrine méthylée de façon aléatoire (*randomly methylated*); SBEβ-CD : sulfobutylether β-cyclodextrine; γ-CD : γ-cyclodextrine; HPγ-CD : 2-hydroxypropyl-γ-cyclodextrine.

IV.5 PHARMACOCINETIQUE DES CYCLODEXTRINES

Les propriétés pharmacologiques et toxicologiques des cyclodextrines natives sont détaillées dans le Tableau 6.

Tableau 6. Pharmacocinétique et toxicité des cyclodextrines natives d'après Del Valle (2004)

Cyclodextrine	Alpha-	Bêta-	Gamma-
Voie parentérale			
Injection intramusculaire	Irritant ++	Irritant +	Irritant +/-
Elimination	Sous forme inchangée par voie urinaire	Nr	Sous forme inchangée par voie urinaire
Voie orale			
Absorption après administration orale	2-3% chez le rat	1-2%	0,1%
Métabolisme dans le tractus digestif supérieur	Non	Non	Rapidement dégradée en glucose
Dégradation	Flore intestinale du caecum et du colon	Flore intestinale du caecum et du colon	Enzymes intestinales
Elimination	CO_2	CO_2	Nr
Dose létale 50 chez le rat			
Voie orale	> 10 000 mg/kg	> 5 000 mg/kg	>> 8 000 mg/kg
Voie intraveineuse	500-750 mg/kg	450-790 mg/lg	≈ 4000 mg/kg
Capacités d'extraction	Lipides	Cholestérol	Nr

IV.5.1 Administration parentérale

Les cyclodextrines natives administrées par voie veineuse disparaissent rapidement de la circulation sanguine et sont excrétées principalement par le rein. Chez le rat, l'administration intraveineuse de gamma-cyclodextrine marquée conduit à une élimination rapide de la circulation sanguine ($t_{1/2}$ = 15-20 minutes). En 24 heures, 90% de la gamma-cyclodextrine administrée est éliminée par voie urinaire [Munro et al., 2004].

Le volume de distribution de la bêta-cyclodextrine chez le rat, le lapin, le chien ou l'Homme correspond au volume de liquide extracellulaire de chaque espèce ce qui laisse suggérer l'absence de compartiments profonds de stockage [Irie & Uekama, 1997].

Parmi les bêta-cyclodextrines modifiées, l'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine et la sulfobutylether-bêta-cyclodextrine sont les plus utilisées par voie parentérale. Leur élimination se fait majoritairement sous forme inchangée par voie rénale. Après une administration par voie intraveineuse, la demi-vie de ces cyclodextrines est de une à deux heures, en fonction des espèces, et leur apparition dans les urines débute une à quatre heures après l'injection [Stella et al., 1999].

IV.5.2 Administration orale

L'absorption gastro-intestinale des cyclodextrines sous forme inchangée est limitée en raison de leur taille et de leur hydrophilie. Les amylases humaines de la salive sont capables d'hydrolyser la gamma-cyclodextrine, principalement en maltose, mais pas l'alpha- ou la bêta-cyclodextrine. Des études d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion, réalisées avec de la gamma-cyclodextrine marquée, ont montré que parmi les produits de la digestion, seul le glucose est assimilé. La diffusion passive de la gamma-cyclodextrine est très faible (< 0,02%) [Munro et al., 2004].

De même, la biodisponibilité orale de la bêta-cyclodextrine varie de 0,1% à 4%. Son absorption est probablement passive et la majorité de la cyclodextrine administrée est métabolisée par la flore intestinale [Stella & Rajewski, 1997].

Les cyclodextrines sont donc relativement bien tolérées *in vivo*. Le devenir des cyclodextrines dans le tractus digestif diffère en fonction de leur résistance à l'hydrolyse et à la dégradation enzymatique. Les cyclodextrines peuvent être dégradées par des amylases bactériennes ce qui explique leur digestion dans le colon par la flore intestinale. Comme les cyclodextrines sont peu absorbées et presque complètement digérées dans le colon, l'exposition systémique aux cyclodextrines après une administration par voie orale est presque insignifiante [Zhang & Rees, 1999]. Le transit des cyclodextrines le long du colon humain est d'environ 40 heures, ce qui est compatible avec la dégradation par les enzymes bactériennes.

Les cyclodextrines modifiées résistent plus aux hydrolases intestinales et sont pour la plupart éliminées dans les selles sous forme inchangée [Irie & Uekama, 1997].

IV.6 TOXICITE DES CYCLODEXTRINES

Les cyclodextrines natives et leurs dérivés hydrophiles traversent difficilement les barrières biologiques lipophiles. Les dérivés lipophiles de la bêta-cyclodextrine, même s'ils interagissent plus avec les membranes, ne les traversent pas beaucoup plus. Toutes les études ont montré que la toxicité orale des cyclodextrines est presque nulle car elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus digestif. De plus, la gamma-cyclodextrine, les 3-hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine, sulphobutylether-bêta-cyclodextrine, maltosyl-bêta-cyclodextrine et les bêta-cyclodextrines sulfatées sont suffisamment sûres pour être administrées par voie parentérale [Del Valle, 2004].

IV.6.1 Toxicité cellulaire

La cytotoxicité des cyclodextrines est liée à leurs interactions avec la membrane plasmique. Elles sont connues pour induire des changements de forme dans la membrane des érythrocytes humains et, à plus forte concentration, une lyse. L'activité hémolytique des cyclodextrines natives peut être classée ainsi : bêta-> alpha-> gamma-cyclodextrine, en liaison avec les différents taux de solubilisation des composants membranaires par les différentes cyclodextrines, notamment les lipides, mais aussi les protéines dans le cas de la bêta-cyclodextrine [Irie & Uekama, 1997].

IV.6.2 Formes orales

La structure chimique des cyclodextrines, leur masse moléculaire et leur coefficient de partage sont toutes des caractéristiques des composés qui ne traversent pas réellement les membranes biologiques. Les études ont montré que seule une portion négligeable des cyclodextrines hydrophiles et des complexes molécule/cyclodextrine sont capables de traverser une membrane lipophile comme la muqueuse gastro-intestinale. Les études de toxicité ont démontré que lorsqu'elles sont administrées par voie orale, les cyclodextrines sont pratiquement non toxiques en raison de l'absence d'absorption au niveau du tractus digestif. Toutefois les bêta-cyclodextrines méthylées lipophiles sont en partie absorbées (≈10%). Par conséquent seule une faible quantité de ces cyclodextrines peut être ajoutée dans des formulations orales [Irie & Uekama, 1997].

Après administration par voie orale, peu d'effets secondaires systémiques sont attribuables aux cyclodextrines elles-mêmes, en raison de leur faible diffusion dans la circulation générale. Mais elles peuvent entraîner des effets secondaires systémiques, notamment la bêta-cyclodextrine, par une augmentation de l'élimination de certains nutriments et acides biliaires au niveau gastro-intestinal [Stella & Rajewski, 1997].

IV.6.3 Formes parentérales

Le principal effet secondaire des cyclodextrines administrées par voie parentérale est la néphrotoxicité sachant que le rein est le seul organe contribuant à l'élimination des cyclodextrines de la circulation systémique [Irie & Uekama, 1997]. La bêta-cyclodextrine, lorsqu'elle est utilisée comme excipient pour les formulations intraveineuses, présente également des effets secondaires hémolytiques liés à la chélation du cholestérol et des acides biliaires [Zhang & Rees, 1999].

La toxicité rénale observée avec les cyclodextrines natives après administration parentérale a été un des moteurs du développement des cyclodextrines modifiées. Les cyclodextrines ont été greffées dans le but d'augmenter la solubilité dans l'eau et ainsi diminuer leur toxicité rénale. Mais, en dépit de cela, certaines cyclodextrines modifiées, comme la dimethyl-bêta-cyclodextrine, sont plus toxiques que la cyclodextrine native dont elles sont dérivées [Stella & Rajewski, 1997].

Les dérivés alkylés de l'alpha- et la bêta-cyclodextrine natives présentent une toxicité rénale non négligeable et sont principalement utilisées par voie entérale [Stella et al., 1999].

L'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine et la sulfobutylether-bêta-cyclodextrine apparaissent comme étant les plus sûres et sont utilisés pour une administration entérale et parentérale [Stella et al., 1999].

La toxicité des cyclodextrines sur la BHE sera détaillée dans un paragraphe spécifique.

IV.7 APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES CYCLODEXTRINES

Dans l'industrie alimentaire, les cyclodextrines ont été étudiées comme stabilisants pour les arômes et pour réduire les goûts et les odeurs désagréables. Dans l'industrie cosmétique, les cyclodextrines ont été testées comme des composants chimiques labiles, pour obtenir une

action prolongée, diminuer une irritation locale ou masquer une odeur désagréable. Le Japon a rapidement été un des plus gros consommateurs au monde de cyclodextrines avec environ 1800 tonnes/an, dont 80% pour l'industrie alimentaire, 10% pour l'industrie cosmétique et moins de 5% pour l'industrie pharmaceutique et l'agriculture. L'usage industriel des cyclodextrines a progressé plus lentement en Europe et aux Etats Unis.

L'usage de nouveaux excipients dans l'industrie pharmaceutique est soumis à une restriction plus grande que l'usage de nouveaux excipients dans les cosmétiques ou l'alimentation. Toutefois est apparu au Japon en 1976 le premier médicament contenant une cyclodextrine : Prostarmon E™ qui est une association de prostaglandine E2 et de β-cyclodextrine, suivi, douze ans après, par l'association piroxicam/β-cyclodextrine puis itraconazole/2-hydroxypropyl-β-cyclodetxrine en 1997. A ce jour, dans le monde, 30 à 40 molécules différentes associées à des cyclodextrines sont commercialisées. Dans les formulations pharmaceutiques, les cyclodextrines sont généralement utilisées comme solubilisants, et parfois comme stabilisants ou pour augmenter la biodisponibilité [Loftsson & Duchene, 2007].

IV.8 UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES DES CYCLODEXTRINES

Beaucoup de travaux démontrent les nombreuses applications possibles des cyclodextrines comme excipient dans les préparations pharmaceutiques. Ne seront traités que quelques exemples, parmi les plus récents, pour les principales applications existantes.

IV.8.1 Applications parentérales

L'intérêt premier de l'utilisation des cyclodextrines dans les formulations pour voie parentérale est d'améliorer la solubilité des molécules faiblement hydrosolubles, permettant une délivrance rapide et massive du principe actif après injection intraveineuse ou intramusculaire.

En raison de la relative toxicité des cyclodextrines natives, la plupart des études récentes portent sur les cyclodextrines modifiées.

IV.8.1.1 Administration intraveineuse

La plupart des études concernant l'utilisation des cyclodextrines pour administration par voie intraveineuse ont été réalisées sur la sulfobutylether-bêta-cyclodextrine ou l'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine en raison de leur bonne innocuité. Des essais cliniques chez l'homme ont prouvé la bonne tolérance du complexe diclofenac/hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine après injection par voie intraveineuse. Cette nouvelle formulation permet en plus une injection en bolus au lieu d'une perfusion de 30 minutes et diminue ainsi l'incidence des thrombophlébites [McCormack & Scott, 2008]. De même, l'emploi de sulfobutylether-bêta-cyclodextrine a permis l'utilisation par voie intraveineuse du voriconazole (un antifongique systémique) en augmentant sa solubilité. Aucune toxicité n'a été démontrée malgré une accumulation de la cyclodextrine dans le plasma des patients traités [Abel et al., 2008].

IV.8.1.2 Administration intramusculaire

Peu d'études ont été publiées sur l'utilisation des cyclodextrines par voie intramusculaire en raison d'une importante irritation au point d'administration [Stella & Rajewski, 1997]. Toutefois, la sulfobutylether-bêta-cyclodextrine est utilisée dans une formulation pour injection intramusculaire (disponible aux Etats Unis) d'un antipsychotique, la ziprasidone, afin d'améliorer la dissolution du principe actif par complexation [Preskorn, 2005].

IV.8.1.3 Irritation au niveau du site d'injection

Au cours d'une injection intraveineuse ou intramusculaire, l'irritation au point d'injection peut provenir de la toxicité intrinsèque du principe actif ou de l'excipient dans lequel la molécule est dissoute. L'irritation due à la molécule peut être réduite par la formation d'un complexe d'inclusion.

Ainsi, sachant que l'irritation causée par un principe actif est liée à la capacité de celui-ci à entraîner une lyse des globules rouges et qu'il a été prouvé que la bêta-cyclodextrine est capable de protéger les globules rouges de l'hémolyse provoquée par le chlorhydrate de chlorpromazine (un médicament du SNC), l'utilisation de bêta-cyclodextrine a permis de

diminuer les dégâts tissulaires causés par l'injection intramusculaire de chlorpromazine chez le lapin [Irie et al., 1983; Shiotani et al., 1994].

IV.8.2 Applications entérales

Les cyclodextrines sont utilisées par voie orale principalement pour :

- augmenter la biodisponibilité en augmentant le taux de dissolution et la stabilité de la molécule active : ainsi, la biodisponibilité par voie orale d'extraits d'isoflavones de soja peut être augmentée par la complexation avec la bêta-cyclodextrine [Lee et al., 2007]

- modifier le site ou la cinétique de libération dans le tractus gastro-intestinal : les saccharides naturels que sont les cyclodextrines peuvent être utilisés comme des prodrogues pour cibler le colon car elles sont stables au pH du tractus gastro-intestinal, non absorbées dans l'estomac et hydrolysées par les enzymes de la flore intestinale du colon. Ainsi, un agent anti-inflammatoire, couplé par une liaison chimique à l'alpha- ou la bêta-cyclodextrine pour former une prodrogue, sera libéré à 60% dans le colon chez le rat [El-Kamel et al., 2008]

- masquer une saveur désagréable [Szejtli & Szente, 2005]. Cette propriété est par exemple utilisée dans la spécialité Calprimum®, comprimé enrobé à croquer (Tableau 7).

Les cyclodextrines par voie orale ont également été utilisées comme contrôle négatif dans des études d'évaluation d'activité anti-fongique, probablement en raison de leur faible absorption au niveau du tractus digestif [Kamberi et al., 2007].

IV.8.3 Applications ophtalmiques

L'utilisation des cyclodextrines en ophtalmologie est assez récente, notamment dans des préparations ophtalmiques contenant des corticostéroïdes. Les collyres de dexaméthasone contenant des cyclodextrines sont bien tolérés et présentent une meilleure biodisponibilité et efficacité clinique que les formulations sans cyclodextrine. De plus, ces formulations permettent une administration en une prise par jour et permettent de réduire l'irritation locale liée à l'application du collyre [Loftsson & Stefansson, 2002].

Une étude réalisée sur la comparaison de solutions ophtalmiques de latanoprost (un anti-glaucomateux), a démontré que la formulation contenant des cyclodextrines améliore considérablement la stabilité du collyre sans pour autant affecter son efficacité ni modifier le taux d'effets secondaires indésirables [Gonzalez et al., 2007]. Par ailleurs, il a été montré que

l'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine augmente la solubilité et la perméabilité oculaire de la puerarine, un agent bêta-bloquant [Wu et al., 2007].

IV.8.4 Applications intranasales

L'utilisation de cyclodextrines lors de l'administration de molécules par voie nasale améliore la biodisponibilité de la molécule hôte au niveau local ou systémique.

Au niveau local, la présence d'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine dans une formulation de comprimés muco-adhésifs de buspirone (un anxiolytique) augmente de 3,5 fois la perméation de la molécule à travers la muqueuse nasale, sans entraîner de cytotoxicité [Khan et al., 2008]. L'augmentation de la disponibilité au niveau nasal peut être attribuée à des modifications de la perméabilité de la muqueuse nasale ou de la solubilité du médicament.

L'administration par voie intranasale d'une molécule thérapeutique permet également d'atteindre le cerveau. Dans ce cas la combinaison aux cyclodextrines permet d'augmenter de trois fois la quantité de médicament présent dans le cerveau, mais également de cibler la région du cerveau à atteindre en fonction de la cyclodextrine utilisée, comme cela a été démontré pour un traitement anti-obésité, le *galanin-like peptide* [Nonaka et al., 2008].

IV.8.5 Applications inhalées

Les cyclodextrines ne sont pas toujours utilisées pour augmenter la diffusion à travers les membranes biologiques. L'administration des antibiotiques dans le poumon par voie inhalée est une possibilité pour améliorer la prise en charge des infections pulmonaires. Mais la molécule administrée par nébulisation doit présenter une hydrosolubilité suffisante et ne pas diffuser au niveau systémique. Ainsi certaines cyclodextrines (β-cyclodextrine méthylée ou hydroxypropyl-β-cyclodextrine) ont été proposées pour augmenter la solubilité dans l'eau de la rifampicine grâce à la formation de complexes hydrosolubles. L'objectif a été atteint, puisque la quantité de rifampicine présente dans le poumon est augmentée par la complexation. De plus il a été montré que la diffusion de la rifampicine *in vitro* sur un modèle d'épithélium alvéolaire constitué d'une monocouche de cellules Calu-3 n'est pas augmentée et le transport paracellulaire et l'intégrité des jonctions serrées ne sont pas altérés. D'autre part, la complexation n'altère pas l'activité antibactérienne de la rifampicine [Tewes et al., 2008].

Cependant, des résultats contradictoires ont été trouvés *in vitro* sur des cellules Calu-3 au cours d'une étude de toxicité et de perméabilité réalisée sur plusieurs cyclodextrines

différentes. En effet, les auteurs concluent que les cyclodextrines peuvent passer dans la circulation générale par absorption au niveau pulmonaire, grâce à une diffusion paracellulaire à travers les alvéoles et les cellules Calu-3 bronchiques. L'étude de toxicité, réalisée sur l'alpha- la bêta-, la gamma-, l'hydroxypropyl-alpha-, l'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine et la bêta-cyclodextrine méthylée de façon aléatoire, conclut à la non toxicité de la gamma-cyclodextrine et des hydroxypropyl-alpha- et bêta-cyclodextrines [Matilainen et al., 2008].

Par ailleurs, d'un point de vue galénique, une proportion adaptée de diméthyl-bêta-cyclodextrine permet de diminuer la formation d'agrégats au cours de la préparation de poudres de particules sèches d'hormone de croissance humaine pour administration par aérosol et permet ainsi d'augmenter la biodisponibilité du principe actif lors d'une insufflation trachéale. Un des mécanismes d'action serait la diminution de la concentration d'hormone libre à l'interface air/eau, grâce à une inclusion partielle de l'hormone de croissance dans la cyclodextrine [Jalalipour et al., 2008].

IV.8.6 Applications dermiques

La présence des cyclodextrines dans les préparations topiques a pour but soit une augmentation de l'action locale de la molécule en augmentant sa solubilité ou sa stabilité, soit une augmentation de l'action systémique de la molécule par l'intermédiaire de l'action combinée de ces deux facteurs et de l'augmentation de la perméabilité membranaire par la cyclodextrine [Rajewski & Stella, 1996].

La distribution systémique d'une molécule après son application cutanée peut reposer sur l'utilisation de systèmes de délivrances transdermiques, aussi appelés patchs transdermiques. La place des cyclodextrines est ici celle d'un excipient dont le rôle est d'augmenter la pénétration de la barrière cutanée. Ainsi la présence de bêta-cyclodextrine partiellement méthylée augmente de trois fois la quantité de bupranolol (un bêtabloquant) délivrée à partir d'un dispositif transdermique et augmente ainsi l'efficacité *in vivo* de la molécule [Babu et al., 2008]. Cette propriété de la bêta-cyclodextrine partiellement méthylée peut s'expliquer par sa capacité à extraire les acides gras cutanés. Une autre étude révélant l'augmentation de l'absorption percutanée de la métopimazine (un anti-émétique) en présence d'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine ou de bêta-cyclodextrine partiellement méthylée a montré la formation de complexes d'inclusion entre les cyclodextrines et le principe actif [Frederic et

al., 2008]. Mais un pourcentage trop élevé de cyclodextrine peut entraîner une rupture du *stratum corneum*, comme cela a été démontré *in vitro* chez le rat [Zi et al., 2008].

A l'inverse, les cyclodextrines sont également utilisées pour augmenter la fixation des principes actifs sur la peau. La complexation du minoxidil, un principe actif destiné à contrer la perte de cheveux, avec de la triamino alpha-cyclodextrine permet d'augmenter la quantité de molécule restant sur la peau après rinçage, grâce aux interactions électrostatiques existantes entre l'amino-cyclodextrine protonée et les charges négatives de la peau. L'augmentation de la quantité de principe actif présent à la surface de la peau se traduit par une augmentation de l'effet thérapeutique attendu (Figure 13) [Kim & Kim, 2007].

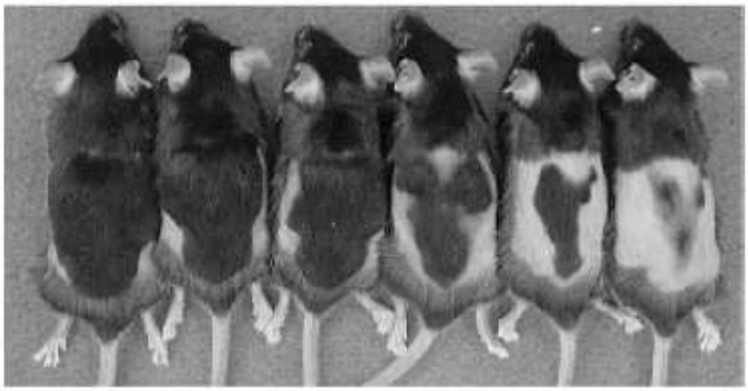


Figure 13. Amélioration *in vivo* de la pousse des cheveux par le minoxidil dans une solution de triamino alpha-cyclodextrine

Cette application peut être utile en pharmacie mais aussi en cosmétique, notamment pour améliorer la tenue des parfums [Numanoglu et al., 2007], ou pour augmenter l'effet protecteur anti-UVA des écrans solaires, en diminuant leur pénétration dans la peau par complexation à l'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine [Yang et al., 2008].

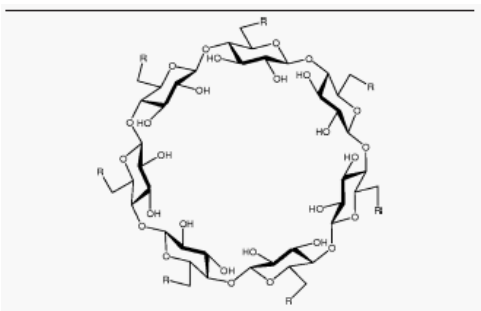
IV.8.7 Action anti-infectieuse propre

Les cyclodextrines peuvent également jouer un rôle en tant que principe actif, que ce soit en virologie ou en bactériologie.

Ainsi, la 2-hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine prévient *in vitro* l'infection de cellules cibles par le VIH ou le SIV (*Simian immunodeficiency virus*), à des doses subtoxiques. Cette action protectrice a été retrouvée *in vivo* après inoculation intravaginale du SIV chez des macaques : l'application de cyclodextrines prévenait la transmission du virus par les muqueuses. Toutefois une deuxième application de cyclodextrine ne protégeait plus l'animal au cours de

la deuxième inoculation sans qu'une explication n'ait été avancée. L'activité anti-VIH de la 2-hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine s'explique par une déplétion du cholestérol de l'enveloppe du virus, inactivant celui-ci, et par l'extraction des phospholipides et du cholestérol des membranes cellulaires, gênant l'entrée du virus dans la cellule [Ambrose et al., 2008].

En bactériologie, des dérivées de la bêta-cyclodextrine peuvent bloquer, *in vivo* chez le rat, la toxine létale de *Bacillus anthracis*, agent de l'anthrax, en bloquant le récepteur de la toxine. Au cours de ces travaux, il a été démontré que les groupements greffés sur la bêta-cyclodextrine (Figure 14) peuvent influencer l'activité protectrice de la cyclodextrine aussi bien *in vivo* que *in vitro* [Moayeri et al., 2008].



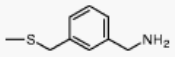
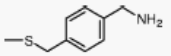
Compound	R	IC_{50} (μM) for inhibition of cytotoxicity
5b	$S(CH_2)_3NH_2$	2.9 ± 1.0
5g	$S(CH_2)_8NH_2$	0.3 ± 0.1
14b		0.5 ± 0.2
14c		0.7 ± 0.5

Figure 14. Dérivés de la bêta-cyclodextrine testés pour bloquer la toxine létale de *Bacillus anthracis*

IV.8.8 Formes commercialisées

Au 1er juin 2008, seize spécialités contenant, parmi leurs excipients, une cyclodextrine native (alpha, bêta ou gamma) ou modifiée (hydroxypropyl- ou sulfobutyl-, ou sulfobutylether-bêta-cyclodextrine) disposaient d'une autorisation de mise sur le marché en France (Tableau 7).

Tableau 7. Médicaments disposant d'une autorisation de mise sur le marché en France et contenant une cyclodextrine (d'après http://www.Theriaque.org)

Nom déposé	Cyclodextrine	Substance active	Classe thérapeutique	Forme galénique
Abilify®	Sulfobutylether-bêta-cyclodextrine*	Aripiprazole	Antipsychotique	Solution injectable
Alairgix®	Bêta-cyclodextrine*	Cetirizine	Antihistaminique H1	Comprimé à sucer
Alopexy®	Gamma-cyclodextrine*	Minoxidil	Antialopécique	Solution pour application cutanée
Brexin®	Bêta-cyclodextrine#	Piroxicam	Anti-inflammatoire	Comprimé et comprimé effervescent
Calprimum®	Bêta-cyclodextrine*	Carbonate de calcium	Apport minéral	Comprimé à croquer
Caverjectdual®	Alpha-cyclodextrine*	Alprostadil	Stimulant de l'érection	Solution pour injection intracaverneuse
Cycladol®	Bêta-cyclodextrine#	Piroxicam	Anti-inflammatoire	Comprimé et comprimé effervescent
Edex®	Alpha-cyclodextrine*	Alprostadil	Stimulant de l'érection	Solution pour injection intracaverneuse
Indobiotic®	Hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine*	Indométacine	Anti-inflammatoire	Collyre
Indocollyre®	Hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine*	Indométacine	Anti-inflammatoire	Collyre

Nicorette microtab®	Bêta-cyclodextrine*#	Nicotine	Désintoxication tabagique	Comprimé sublingual
Sporanox®	Hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine*	Itraconazole	Antifongique systémique	Solution buvable
	Hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine*	Itraconazole	Antifongique systémique	Solution pour injection intraveineuse
Takediam®	Alpha-cyclodextrine*	Cefotiam hexetil	Antibactérien systémique	Comprimé
Texodil®	Alpha-cyclodextrine*	Cefotiam hexetil	Antibactérien systémique	Comprimé
True test®	Bêta-cyclodextrine*	Sulfate de nickel	Allergènes	Dispositif transdermique
VFend®	Sulfobutyl-bêta-cyclodextrine*	Voriconazole	Antifongique systémique	Solution pour injection intraveineuse

* Utilisée comme excipient

Complexée au principe actif

Ces médicaments sont destinés à être administrés par voie parentérale, orale, ophtalmique ou dermique.

IV.9 CYCLODEXTRINES ET RIBAVIRINE

Les interactions physico-chimiques entre la ribavirine et les cyclodextrines ont été caractérisées par différentes techniques : chromatographie liquide haute performance (CLHP), résonance magnétique nucléaire, spectroscopie infrarouge et thermogravimétrie. Le rapport stœchiométrique des complexes est d'une molécule de ribavirine pour une molécule de cyclodextrine (rapport 1:1) et les constantes de stabilité sont de 1493, 2606 et 1179 M^{-1} pour les complexes de la ribavirine avec respectivement l'alpha-, la bêta- et la gamma-cyclodextrine. Le complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine est donc celui qui présente la meilleure stabilité. La ribavirine n'est pas incluse à l'intérieur de la cavité des cyclodextrines, mais la complexation de la ribavirine aux différentes cyclodextrines natives conduit plutôt à un complexe intermoléculaire d'association [Grancher et al., 2005].

La cytotoxicité des cyclodextrines et des complexes ribavirine/cyclodextrine a été évaluée sur des cellules de rein de singe (Cellules Vero), par un test MTT. La concentration cytotoxique 50 (CC50) de l'alpha- et la bêta-cyclodextrine (8 mM et 6,8 mM respectivement) est proche de celle de la ribavirine (6,8 mM) alors que la gamma-cyclodextrine est moins toxique (CC50 > 8mM). La cytotoxicité des complexes ribavirine/cyclodextrine varie de 0,8 à 0,45 mM (bêta = 0,45 > alpha = 0,61 > gamma = 0,8) [Grancher et al., 2004].

L'évaluation de l'activité antivirale de la ribavirine au sein des complexes ribavirine/alpha-cyclodextrine, ribavirine/bêta-cyclodextrine et ribavirine/gamma-cyclodextrine a été réalisée *in vitro* sur cellules Vero contre deux souches différentes du virus de la rougeole, la souche Edmonston et la souche CAM/RB. La complexation de la ribavirine à l'alpha- ou la bêta-cyclodextrine entraîne, respectivement, une diminution de cinq et deux fois de la concentration inhibitrice 50. La complexation à la gamma-cyclodextrine n'apporte pas de modification [Grancher et al., 2004].

Une étude précédente portant sur le ganciclovir, un autre agent antiviral analogue nucléosidique, avait démontré l'avantage de la complexation à la bêta-cyclodextrine [Nicolazzi et al., 2001; Nicolazzi et al., 2002].

Les cyclodextrines sont utilisées de manière générale dans deux grands buts : améliorer la solubilité des molécules hydrophobes et faciliter l'absorption de la molécule hôte à travers les différentes membranes physiologiques telles que la peau, les muqueuses orales, nasales ou intestinales et la barrière hémato-encéphalique. Le comportement des cyclodextrines vis-à-vis de la barrière hémato-encéphalique a été étudié sur un modèle *in vitro*, démontrant une augmentation de la perméabilité par extraction de la phosphatidylcholine, de la sphingomyéline et du cholestérol à partir de la membrane [Monnaert et al., 2004a]. Le comportement des cyclodextrines vis-à-vis de la barrière hémato-encéphalique nécessite donc d'être approfondi *in vivo*.

V. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

Le SNC des vertébrés est protégé par une structure tissulaire particulière nommée Barrière Hémato-Encéphalique. La BHE maintient l'homéostasie du SNC en le protégeant des toxines neurologiques et des micro-organismes. D'un autre côté, la BHE peut empêcher les agents thérapeutiques d'arriver en concentration suffisante dans le cerveau, gênant ainsi le traitement des infections du SNC [Kuo & Su, 2007]. Il est ainsi plus aisé de comprendre les difficultés qu'il y a à développer un nouveau médicament du SNC, considérant que 98% des nouvelles molécules sont incapables de passer la BHE.

V.1 BIOLOGIE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

V.1.1 Anatomie

Le cerveau est un des organes les plus importants du corps humain, si ce n'est le plus important et son homéostasie est primordiale. Des interfaces spécifiques, appelées également barrières, régulent les échanges entre le sang circulant périphérique et le LCR. Ces barrières sont représentées par l'épithélium du plexus choroïde (sang - LCR ventriculaire), l'épithélium arachnoïdien (sang - LCR sous-arachnoïdien) et la BHE (sang - fluide interstitiel du cerveau). La concentration et la clairance de molécules endogènes et exogènes, nécessaires à l'activité normale du cerveau ou dangereuses par leur toxicité, sont strictement régulées par les caractéristiques anatomiques et physiologiques de ces barrières. La présence de la BHE est sans doute le point le plus critique pour l'accès des molécules au niveau du cerveau [Blasi et al., 2007].

V.1.2 Vascularisation et cellules endothéliales

La micro-vascularisation du cerveau, en l'absence de la BHE, représenterait une extraordinaire voie d'accès au cerveau, avec la possibilité de distribuer virtuellement des molécules thérapeutiques à toutes les zones du cerveau. En effet, même si le volume occupé par les capillaires et les cellules endothéliales représente respectivement 1% et 0,1% du volume du cerveau, la micro-vascularisation du cerveau développe une surface totale d'environ 20 m^2 et une longueur totale d'environ 640 km. Cette importante vascularisation lui

confère un réseau très complexe de capillaires avec une distance moyenne de 40 µm entre les capillaires, ce qui signifie que chaque cellule du cerveau est placée virtuellement à une distance de 20 µm d'un capillaire, créant un espace facilement perméable par simple diffusion en une demi seconde (pour les petites molécules) [Blasi et al., 2007].

Malheureusement, les caractéristiques physiologiques de la micro-vascularisation du cerveau réduisent énormément le nombre de molécules pouvant arriver au cerveau après une administration systémique. Les capillaires cérébraux différent des capillaires périphériques car ils ne présentent pas de *fenestrae* et possèdent un faible taux de vésicules de pinocytose et des jonctions serrées particulières, connues sous le nom de *zonula occludens*. Les jonctions serrées sont des structures qui forment un joint étroit et continu autour de chaque cellule endothéliale et épithéliale. Leur rôle est la régulation stricte du mouvement des molécules au niveau du passage intercellulaire. Les jonctions serrées endothéliales de la BHE présentent des différences dans leur morphologie, leur composition et des caractéristiques complexes par rapport aux épithéliums et endothéliums périphériques. Ces structures, avec les cellules endothéliales du cerveau, forment une barrière quasi-imperméable pour les médicaments administrés par la circulation périphérique (Figure 15) [Blasi et al., 2007].

V.1.3 Astrocytes et péricytes

Une contribution supplémentaire aux fonctions particulières de la BHE est apportée par les structures accessoires périendothéliales représentées par les astrocytes, les péricytes et la membrane basale. Les astrocytes, généralement classés en fibreux et protoplasmiques, représentent le composant majeur de la masse cérébrale (≈ 90%). Les astrocytes fibreux ont une morphologie en étoile et présentent souvent de nombreux prolongements longs qui finissent dans la membrane basale de la BHE. Ces cellules ont une multitude de fonctions importantes pour l'homéostasie du cerveau (maintien du niveau de K^+, inactivation des neurotransmetteurs, régulation et production de facteurs de croissance et de cytokines), dont la majorité sont reliées à la production d'apolipoprotéine E. Les péricytes sont des cellules sphériques possédant un noyau saillant et un grand nombre de lysosomes primaires et secondaires dans le cytoplasme. Ils semblent impliqués dans la formation, la différenciation et l'intégrité de la BHE [Blasi et al., 2007].

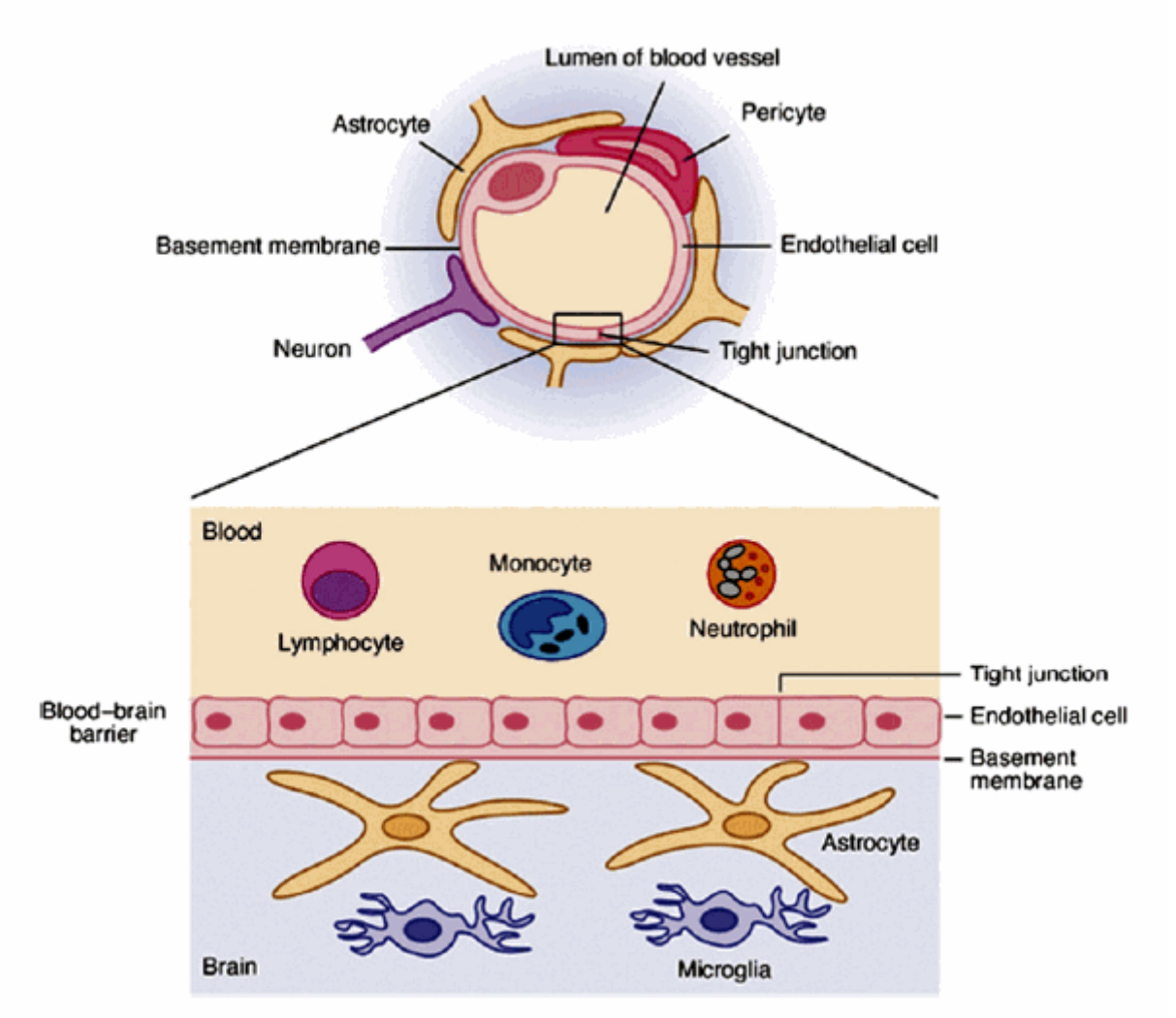


Figure 15. Structure de la barrière hémato-encéphalique [Blasi et al., 2007]

V.2 PASSAGE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

V.2.1 Systèmes de transport

Il existe différentes voies pour le transport des molécules à travers la BHE. La diffusion passive dépend de la lipophilie et de la masse moléculaire de la molécule : le transport des composés hydrophiles par la voie paracellulaire est limité alors que les molécules lipophiles de moins de 400-600 Da peuvent entrer librement dans le cerveau par la voie trans-cellulaire. A côté des systèmes de transport par diffusion passive lipophilique ou par diffusion facilitée (ne nécessitant pas d'énergie), des systèmes de transport actif (nécessitant de l'énergie) peuvent

être divisés en trois classes (Figure 16) : la transcytose *via* un récepteur (a), par adsorption (b), ou *via* un transporteur (c) [de Boer & Gaillard, 2007a].

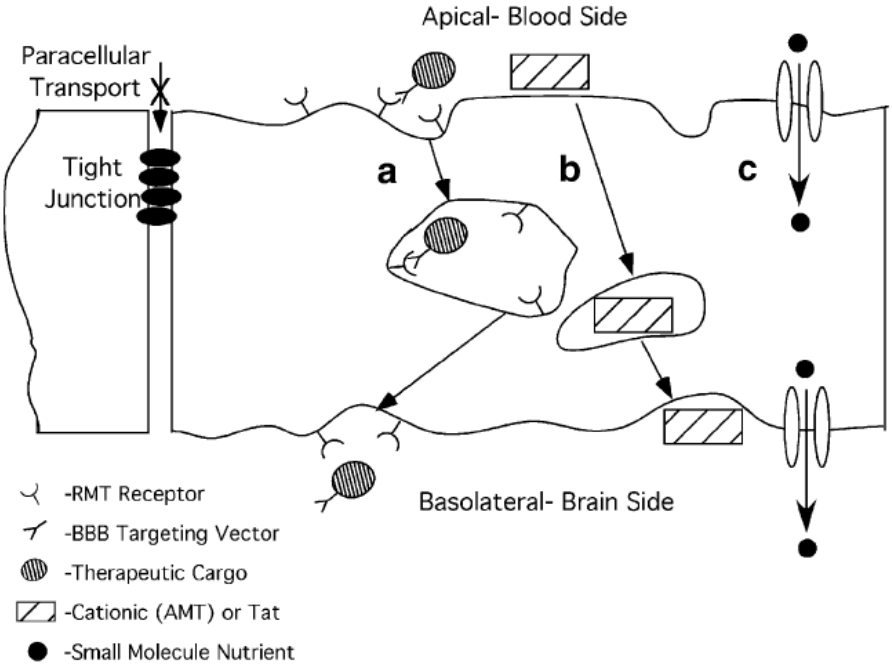


Figure 16. Différentes voies de transport à travers la BHE [Pardridge, 2007]

Les systèmes de transport guidés par adsorption sont initiés par la fixation d'une substance polycationique aux charges négatives de la membrane plasmique. Ce processus n'implique pas de liaison spécifique à un récepteur membranaire. Après la fixation du composé cationique à la membrane cellulaire, le phénomène d'endocytose se produit, suivi de la formation d'endosomes. Toutefois le transport vésiculaire est activement régulé dans la BHE pour protéger le cerveau des composés polycationiques non spécifiques. Par conséquent, forcer les molécules à entrer dans le cerveau par transcytose guidée par adsorption va à l'encontre des fonctions neuro-protectrices de la BHE [de Boer & Gaillard, 2007a].

Le transport de molécules par des transporteurs est utilisé pour délivrer des nutriments, comme du glucose, des acides aminés ou des bases puriques, au cerveau. Il nécessite la présence de ces systèmes de transport des deux côtés de la cellule. Ce mode de transport est

sélectif du substrat et le taux de transport est dépendant du degré d'occupation des transporteurs. Ainsi, seules les molécules qui miment parfaitement les substrats endogènes des transporteurs sont prises en charge et transportées dans le cerveau [de Boer & Gaillard, 2007a].

A l'inverse, les systèmes de transport dirigés par des récepteurs permettent à des molécules plus grosses, comme les peptides, les protéines ou les gènes à entrer spécifiquement dans les cellules du cerveau après englobement dans une vésicule endosomale et exocytose à partir de ces vésicules ou à partir du cytosol. (ex : récepteurs à insuline, à transferrine ou à lipoprotéines de faible densité). En général, ces processus se déroulent en trois étapes : endocytose du composé à partir de la face luminale (côté sang), déplacement dans le cytoplasme endothélial et exocytose de la molécule sur la face abluminale (côté cerveau) de l'endothélium capillaire cérébral [de Boer & Gaillard, 2007a].

En plus des nombreux mécanismes d'influx, plusieurs mécanismes d'efflux ont été décrits dans la BHE. Le plus connu est la protéine P-gp. Cette protéine transmembranaire est localisée dans la membrane apicale des cellules de l'endothélium capillaire du cerveau. Elle possède une forte affinité pour un grand nombre de composants cationiques ou lipophiles et ainsi limite le transport de nombreuses molécules dans le cerveau, notamment les molécules cytotoxiques, antibactériennes, hormonales ou inhibitrices de la protéase du VIH. D'autres mécanismes d'efflux (MDR, *Multi drug resistance*) ont également été décrits [de Boer & Gaillard, 2007a].

V.2.2 Transport de molécules exogènes

En raison des jonctions serrées bloquant l'espace intercellulaire entre les cellules endothéliales, les agents thérapeutiques doivent passer à travers la cellule ou être transportés par l'un des mécanismes décrits.

En théorie, une molécule devrait posséder des caractéristiques physicochimiques particulières pour franchir la BHE, comme une importante lipophilie et une masse moléculaire inférieure à 500 Da. Cette règle est invalidée par la présence des systèmes transporteurs dans différentes régions de la BHE, conférant à celle-ci ses propres

caractéristiques de perméabilité dynamique, difficilement prédictives en considérant uniquement la lipophilie et la masse des molécules [Blasi et al., 2007].

Les systèmes de diffusion des nutriments, facilités par les transporteurs, peuvent être capables d'acheminer les drogues ou les pro-drogues dans le cerveau à des concentrations thérapeutiques. L'utilisation du transport par les récepteurs pour accéder au cerveau est une autre stratégie intéressante. Les récepteurs pour les grosses molécules endogènes (insuline, transferrine, leptine, apolipoprotéine,..) hautement exprimés du côté luminal de la BHE, sont responsables de leur transport dans le cerveau par transcytose. La liaison des drogues ou des transporteurs de drogues (liposomes par exemple) à des ligands spécifiques (peptides) ou des anticorps monoclonaux peptidomimétiques rend possible le transport du complexe dans le cerveau en mimant une molécule endogène. Malheureusement, la présence de transporteurs actifs d'efflux dans la BHE limite également l'efficacité thérapeutique des drogues virtuellement capables d'accéder au cerveau [Blasi et al., 2007].

Ainsi, il a été prouvé, *in vitro* comme *in vivo*, que les P-gp de la BHE peuvent prévenir l'accumulation de nombreuses molécules médicamenteuses (vincristine, anthracyclines, taxanes, cyclosporine A, digoxine, dexaméthasone, etc) dans le cerveau. L'inhibition des P-gp a été proposée comme une stratégie possible pour augmenter l'entrée des molécules dans le cerveau. Certains des tensioactifs utilisés dans les formulations pharmaceutiques ont été montrés comme inhibant la P-gp et certains d'entre eux sont actuellement en cours d'étude pour le traitement de tumeurs multi-résistantes [Blasi et al., 2007].

V.2.3 Augmentation de la délivrance

V.2.3.1 Augmentation de la délivrance passive

Les grosses molécules ou les systèmes de diffusion de molécules (systèmes de transport de la taille du nanomètre, incluant les polymères, les émulsions, les micelles, les liposomes et les nanoparticules) peuvent atteindre le cerveau par diffusion passive comme les petites molécules, mais leur distribution au niveau du cerveau est très faible. La diffusion peut être augmentée lorsque la perméabilité des vaisseaux sanguins dans le tissu cible est modifiée par une pathologie. L'accumulation de la molécule peut ainsi être observée dans les zones périphériques du cerveau. Malheureusement, cette augmentation de la perméabilité vasculaire

est insuffisamment efficace pour le traitement des pathologies humaines [de Boer & Gaillard, 2007b].

La diffusion des molécules dans le cerveau peut être augmentée selon différentes techniques. L'une d'entre elles est la rupture de la barrière par contraction osmotique après administration d'une solution hypertonique de mannitol dans la carotide. Lors de l'administration de la molécule thérapeutique, une concentration plus élevée peut être atteinte dans le cerveau ou dans le tissu tumoral. Toutefois, en raison de l'ouverture temporaire de la BHE, les neurones peuvent être abîmés de façon définitive suite à l'entrée de composés indésirables présents dans le sang. Cette procédure ne peut être appliquée que lorsque l'enjeu est vital. Une approche moins agressive est l'administration intra-carotidienne d'alkyl glycérol qui augmente principalement le transport des molécules par voie paracellulaire. Un autre procédé est l'application de bradykinines car il a été démontré qu'elles augmentaient la perméabilité de la BHE en ouvrant les jonctions serrées par un mécanisme récepteur-dépendant [de Boer & Gaillard, 2007b].

V.2.3.2 Augmentation de la délivrance par des récepteurs

L'utilisation d'un système de transcytose induit par un récepteur permet la diffusion spécifique et sélective à un site de l'organisme. L'avantage d'un ciblage actif est l'augmentation de la quantité de molécules dans le tissu cible, permettant une meilleure réponse pharmacologique et une diminution des effets secondaires systémiques. Le système de transcytose le mieux caractérisé pour le ciblage des molécules dans le cerveau est le récepteur à transferrine, une glycoprotéine transmembranaire. Le ciblage des molécules par le récepteur à transferrine peut être réalisé *via* le ligand endogène, la transferrine, ou en utilisant un anticorps anti-transferrine. Un autre système de transport bien caractérisé implique le récepteur à insuline, mais son utilisation pour cibler des molécules au niveau du cerveau a été moins décrite. Les récepteurs des lipoprotéines et le récepteur de la toxine diphtérique sont également en cours d'étude. Le transport induit par un récepteur permet la diffusion spécifique de la plupart des molécules actives, ou des vecteurs de molécules, comme les liposomes, les systèmes polymères ou les nanoparticules dans le cerveau [de Boer & Gaillard, 2007b].

V.3 EXPLORATION DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

V.3.1 Limites des modèles *in vitro*

Bien que l'endothélium soit le site de la barrière physique, biochimique et métabolique entre le sang et le cerveau, son phénotype spécialisé est dépendant des interactions entre l'endothélium et le tissu environnant. Différents aspects des fonctions de la BHE sont influencés par le contact avec les astrocytes, les péricytes, les neurones, ainsi que la matrice extra-cellulaire. Ainsi, bien que le phénomène de la BHE soit dirigé principalement par l'endothélium capillaire, les fonctions spécialisées sont induites et modulées par les interactions avec les autres constituants du bloc neurovasculaire. En termes pratiques, ceci indique une sévère limitation des modèles basés sur la culture cellulaire, notamment en posant les questions de comment les processus des pathologies complexes influencent ou sont influencés par la BHE. Tandis que les modèles de culture cellulaire continuent à servir en tant qu'outils indispensables à la recherche sur la BHE, les études transversales sur la physiopathologie de la BHE nécessitent des modèles animaux et des méthodes adaptées [Hawkins & Egleton, 2008].

V.3.2 Méthodes fondées sur les animaux

Généralement, la mesure de la perméabilité de la BHE implique l'introduction d'un traceur dans la circulation périphérique et la mesure de sa pénétration dans le cerveau. Un marqueur idéal de la perméabilité devrait être trop polaire pour passer à travers les cellules endothéliales de la membrane, non transporté activement par la BHE dans aucune des directions, facilement mesurable en raison de ses propriétés radioactives, fluorescentes, spectroscopiques ou paramagnétiques, et stable durant le temps de l'expérience [Hawkins & Egleton, 2008].

Tableau 8. Marqueurs les plus couramment utilisés pour étudier la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique [Hawkins & Egleton, 2008]

Sonde	Masse moléculaire (Da)	Détection	Références
Mannitol	182	Radioactive (^{14}C ou ^{3}H)	[Preston et al., 1995]
Sucrose	342	Radioactive (^{14}C ou ^{3}H)	[Hawkins et al., 2007; Huber et al., 2006]
Fluoresceine		Fluorescence	[Farkas et al., 1998; Natah et al., 2005]
gadolinium-DTPA	570	Résonance magnétique	[Barzo et al., 1996; Ewing et al., 2003; Knight et al., 2005]
Inuline	5000	Radioactive (^{14}C ou ^{3}H)	[Huber et al., 2006; Juhler et al., 1984]
Horseradish peroxidase	≈ 44 000	Microscopie électronique	[Carvey et al., 2005; Reese & Karnovsky, 1967]
Albumine	≈ 65 000	Absorption Radioactivité (^{125}I)	[Huber et al., 2006]
Fluoresceinscent-labeled dextrans	400-250 000	Fluorescence	[Gaber et al., 2004; Mooradian et al., 2005; Olsson et al., 1975]

Le Tableau 8 résume les marqueurs de perméabilité les plus utilisés pour les études *in vivo*. La plupart des techniques décrites ci-après ont été développées pour l'étude du transport des molécules, mais peuvent être appliquées à l'étude de la physiopathologie de la BHE.

V.3.2.1 Injection intraveineuse

Le moyen le plus direct pour estimer les fonctions de la BHE est d'introduire un traceur dans la vascularisation périphérique par injection intraveineuse suivi d'une évaluation qualitative et quantitative de la perméation du traceur dans le cerveau. C'est l'approche la moins invasive et qui permet la circulation du traceur dans des conditions physiologiques. En raison des multiples passages à travers la microvascularisation, c'est un des moyens les plus sensibles pour mesurer les fonctions de la BHE, notamment lorsque des traceurs radioactifs sont utilisés [Hawkins & Egleton, 2008].

V.3.2.2 Index d'assimilation du cerveau

La méthode d'index d'assimilation du cerveau consiste à introduire un traceur directement dans le sang cérébral (i.e. par l'artère carotide) et de l'empêcher de re-circuler (ablation rapide, < 15 secondes, du cerveau) pour le soustraire au métabolisme périphérique. Elle a été développée chez le rat [Oldendorf, 1970] mais son usage reste limité notamment en raison du court temps d'exposition qui limite la sensibilité de la mesure pour les composés relativement imperméables. Un autre désavantage de cette méthode est la difficulté à contrôler les concentrations réelles du traceur dans le plasma en raison d'un mélange inhomogène du bolus avec le sang et l'absence de contrôle du débit sanguin [Hawkins & Egleton, 2008].

V.3.2.3 Perfusion in situ dans le cerveau

La technique de perfusion *in situ* dans le cerveau, développée par Takasato *et al.* [Takasato et al., 1984] reprend les avantages d'une approche en passage unique sans les limites de la méthode d'index d'assimilation du cerveau : le cerveau est perfusé avec un tampon physiologique oxygéné contenant un traceur radio-marqué. La perfusion par la carotide va permettre un contrôle expérimental du débit et de la composition de la perfusion. Des variations de ce protocole ont été développées pour adapter cette technique du rat au cobaye

et à la souris. Les limites de cette technique sont la capacité à réaliser le procédé chirurgical en peu de temps (6-10 minutes chez le rat adulte) [Hawkins & Egleton, 2008].

Les fonctions de la BHE ont également été mesurées par microdialyse ou autoradiographie quantitative. Ces deux techniques sont mieux adaptées à l'étude des caractéristiques de la BHE, en particulier dans certaines régions du cerveau. Dans le cas de la microdialyse, les mesures sont limitées par la proximité immédiate de la sonde, tandis que l'autoradiographie quantitative, permettant une analyse globale de la perméation des traceurs, est une technique très lourde [Hawkins & Egleton, 2008].

V.4 PATHOLOGIES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

V.4.1 Modification des jonctions serrées

V.4.1.1 Hypoxie et Ischémie

L'ischémie cérébrale conduit à une rupture du débit sanguin, augmentant la perméabilité de la BHE. Elle est associée à une déplétion rapide en nutriments essentiels et en oxygène. Il a été démontré que l'hypoxémie et la ré-oxygénation augmentent la perméabilité de la BHE et sont associées à une détérioration des jonctions serrées. La rupture des jonctions serrées est probablement impliquée dans la progression des lésions ischémiques du cerveau [Persidsky et al., 2006].

V.4.1.2 Inflammation

Les conditions inflammatoires sont caractérisées par une rupture de la BHE et une ouverture des jonctions serrées. Ainsi au cours de l'encéphalite à VIH, suite à l'infection des macrophages, la microglie produit des cytokines, des chémokines, des espèces réactives de l'oxygène, du glutamate et des métalloprotéinases qui peuvent altérer l'expression et les fonctions des jonctions serrées. Les protéines virales secrétées par les cellules infectées affectent également directement l'expression des jonctions serrées et leur fonction. De plus, les interactions entre les macrophages cérébraux activés et les astrocytes amplifient la réponse inflammatoire, conduisant à une altération de la BHE par des effets sur les cellules

endothéliales de la microvascularisation du cerveau ou une augmentation de la migration des monocytes [Avison et al., 2004].

Le relâchement des jonctions serrées de la BHE peut également être observé dans d'autres états inflammatoires tels que la sclérose en plaque ou la maladie d'Alzheimer [Persidsky et al., 2006].

V.4.1.3 Tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales peuvent altérer la BHE, augmentant la perméabilité vasculaire. L'expression des jonctions serrées diminue ou est complètement perdue au cours des tumeurs cérébrales primaires ou métastatiques. Les cytokines et les facteurs de croissance, sécrétés par la tumeur, sont impliqués dans les mécanismes de régulation des jonctions serrées [Persidsky et al., 2006].

V.4.2 Altération des systèmes de transport

Un certain nombre de désordres neurologiques sont associés à une expression altérée des transporteurs qui peuvent jouer un rôle dans leur pathogenèse. Il a été démontré que l'expression de P-gp est inversement corrélée au dépôt de protéine β-amyloïde dans la maladie d'Alzheimer. La sur-expression des transporteurs dans la BHE a été décrite au cours de l'épilepsie mais il n'a pas été clairement démontré si cela résulte de l'exposition aux médicaments, substrats de P-gp, ou si cela fait partie des mécanismes pathogéniques de l'épilepsie. L'activité de P-gp est également augmentée dans l'endothélium capillaire cérébral après une ischémie cérébrale localisée, et diminuée au cours de la maladie de Parkinson [Persidsky et al., 2006].

Au cours des stades infectieux, il a été démontré que l'expression et l'activité fonctionnelle de P-gp et des protéines associées à la résistance aux médicaments (*MDR-associated proteins*) sont augmentées dans les cellules endothéliales du cerveau de souris traitées avec la protéine Tat du VIH-1, alors que l'expression de P-gp est diminuée dans les cellules de l'endothélium microvasculaire du tissu cérébral d'un patient atteint d'encéphalite à VIH-1, indiquant que la combinaison de la réponse inflammatoire et de l'infection virale peuvent conduire à des dysfonctions de la BHE [Persidsky et al., 2006].

V.4.3 Migration des leucocytes

Une migration sous contrôle des leucocytes est un élément physiologique clé de la surveillance immunitaire, de l'autorégulation de l'inflammation aiguë et de la reconnaissance des antigènes. Une migration transendothéliale non régulée des leucocytes et leur accumulation tissulaire sont un signe du processus inflammatoire pathologique chronique (encéphalite, sclérose en plaque). La dégradation de la BHE au cours de l'inflammation du SNC semble découler de la rupture des jonctions serrées entre les cellules endothéliales de la microvascularisation cérébrale suivie de la formation d'une voie paracellulaire qui facilite l'entrée des leucocytes dans le parenchyme cérébral [Persidsky et al., 2006].

V.5 BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE ET RIBAVIRINE

Peu d'études ont été réalisées pour étudier le passage de la ribavirine à travers la BHE (sept références PubMed pour Blood brain barrier/Ribavirin).

Dès 1981, il a été montré chez le singe et le rat que le cerveau prélevait peu la ribavirine à partir du compartiment sanguin [Ferrara et al., 1981]. Le passage de la ribavirine dans le LCR a été décrit dès 1986 [Crumpacker et al., 1986], mais peu de travaux ont été réalisés ensuite. En revanche, l'administration par aérosol permet d'atteindre des concentrations de ribavirine plus élevées, et la clairance de la molécule au niveau du tissu cérébral est assez lente [Gilbert & Wyde, 1988].

En 2001, un article rapporte le cas de deux patients atteints de PESS chez lesquels un traitement intraveineux de ribavirine à fortes doses (30 mg/kg, 3 fois/jour) a permis d'atteindre des concentrations efficaces dans le LCR. Ce traitement était associé à des injections intrathécales d'interféron [Hosoya et al., 2001].

D'autres travaux traitent de la tiazofurine, un analogue nucléosidique de structure similaire à la ribavirine, qui semble transportée par un mécanisme actif à travers la BHE [Redzic et al., 1996; Redzic et al., 1995].

V.6 BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE ET CYCLODEXTRINES

Les interactions entre les cyclodextrines alpha, bêta et gamma- natives ou modifiées ont été étudiées sur un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique. Globalement, les cyclodextrines alpha natives sont plus toxiques que les modifiées alors que les modifications

affectent peu la toxicité de la bêta-cyclodextrine. Cette toxicité est liée à une ouverture des jonctions serrées et à un efflux de lipides. A concentration non toxique, les cyclodextrines traversent peu la BHE et les modifications chimiques affectent de façon contradictoire le passage des cyclodextrines à travers la BHE [Monnaert et al., 2004b].

La BHE se comporte comme une barrière en raison de la présence de jonctions serrées et comme un transporteur en raison de la présence de pompe d'efflux ATP-dépendante, la P-gp. L'augmentation du passage de la doxorubicine à travers un modèle *in vitro* de BHE en présence de bêta-cyclodextrines modifiées (rame-bêta-cyclodextrine et crysme-bêta-cyclodextrine), sous forme non complexée peut s'expliquer par deux mécanismes : une interaction entre les cyclodextrines et la BHE entraînant une fragilisation de la BHE sans perte de l'intégrité ou une modulation de l'activité de la P-gp. Les auteurs ont démontré que les bêta-cyclodextrines modifiées pouvaient augmenter spécifiquement le transport des substrats de la P-gp. Finalement ces deux mécanismes sont reliés, puisque l'extraction de cholestérol modifie la composition lipidique de la membrane, et donc la localisation de la P-gp, il en résulte une perte d'activité de la P-gp [Tilloy et al., 2006].

A notre connaissance il n'existe pas de travaux décrivant *in vivo* l'impact des cyclodextrines sur la BHE ni l'intérêt de leur utilisation dans des formulations pharmaceutiques visant à traiter des pathologies du SNC.

Par leurs propriétés d'extraction du cholestérol, les cyclodextrines vont également jouer un rôle indirect dans des études visant à étudier la structure de la BHE et l'influence du cholestérol dans les fonctions de la BHE [Huang et al., 2007].

La barrière hémato-encéphalique protége le cerveau des agents infectieux présents dans l'organisme, mais également des molécules thérapeutiques. Cette barrière physiologique s'oppose ainsi au traitement de nombreuses pathologies infectieuses ou cancéreuses du système nerveux central. La recherche pharmaceutique doit donc favoriser le développement de nouvelles molécules capables d'être transportées à travers la barrière hémato-encéphalique, mais également améliorer la diffusion jusqu'au cerveau des nombreuses molécules efficaces.

MATERIEL ET METHODES

VI. MATERIEL

VI.1 MATERIEL UTILISE POUR LES ETUDES D'ACTIVITE ANTIVIRALE *IN VIVO*

VI.1.1 Réactifs et consommables

VI.1.1.1 Traitement et inoculation des souris

- Ribavirine (MP Biomedicals).
- Alpha-cyclodextrine et bêta-cyclodextrine (Wacker-Chemie GmbH).
- Eau pour préparation injectable, EPPI, (Aguettant).
- Kétamine.
- Atropine.
- Xylazine, Rompun® (Bayer).
- Trizol® (Invitrogen).
- Seringue à insuline U-100 Insulin, 0,33 x 12,7 m (Becton Dickinson).
- Aiguilles 25G, 0,5 x 16 mm (Becton Dickinson).

VI.1.1.2 Techniques de biologie moléculaire

- SYBR Green PCR master Mix (Applied Biosystem).
- TaqMan PCR universal master mix (Applied Biosystem).
- RNAse out (Invitrogen).
- MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystem).

Les séquences des amorces et des sondes utilisées pour les techniques de biologie moléculaire sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9. Séquences des amorces et des sondes utilisées dans les techniques de biologie moléculaire

Nom	Séquence nucléotidique	Position	Tm (°C)	% de GC
RT-PCR dans le gène N du virus de la rougeole en méthode SYBR Green				
Jw1 (sens)	5'CAGGACAGTCGAAGGAGGTCAGCT3'	1563 à 1583	58,3	54,1
Rv (antisens)	5'GGGTGTCCGTGTCTGAGCCTTG3'	1650 à 1629	61,9	63,6
RT-PCR du gène N du virus de la rougeole en méthode TaqMan				
N1 (sens)	5'TCA GTA GAG CGG TTG GAC CC 3'	1324 à 1343	52	60
N1 (antisens)	5'GGC CCG GTT TCT CTG TAG	1474 à 1455	52	60
Sonde N1	5' (6-FAM) CAA ACA GAG TCG AGG AGA AGC CAG GGA (Tamra)3'	1427 à 1453	65	55,5
RT-PCR du gène de la GAPDH murine				
GAPDH (sens)	5'CGT GGT TCA CAC CCA TCA CAA A3'	/	54	/
GAPDH (antisens)	5'AAT TCA ACG GCA CAG TCA AGG C3'	/	54	/

VI.1.2 Souris

Souris CBA/ca consanguines sevrées, âgées de trois à quatre semaines (poids de 10 g à 15 g) de B&K Universal.

VI.1.3 Souches de virus

Un pool de travail de virus a été préparé à partir d'un homogénat de cerveaux de souriceaux âgés de cinq mois inoculés avec la souche neurovirulente CAM/RB [Neighbour et al., 1978] du virus de la rougeole. Ce même pool a été utilisé pour toutes les expériences de

biologie et de pharmacocinétique. Le pool viral a été initialement titré à 7,40 log10 Eq. UFP/ml par la méthode des dilutions limites [Wyshak & Detre, 1972], puis titré régulièrement.

VI.1.4 Appareillages de biologie moléculaire

Les RT-PCR du gène N du virus de la rougeole et du gène de la GAPDH murine ont été réalisées sur un l'appareil ABI Prism 7000 (Applied Biosystem) qui se compose d'un thermocycleur disposant d'un système optique d'excitation et de détection de la fluorescence et d'un logiciel d'exploitation des résultats.

VI.2 MATERIEL UTILISE POUR LES ETUDES PHARMACOCINETIQUES

VI.2.1 Réactifs et consommables

- Ribavirine (MP Biomedicals).
- Alpha-cyclodextrine (Wacker-Chemie GmbH).
- 3-méthylcytidine méthosulfate (Sigma)
- Acétonitrile (Carlo Erba Reagenti).
- Acide formique (Carlo Erba Reagenti).
- Acétate d'ammonium [CH_3COONH_4] (Merck).
- Phosphate d'ammonium monobasique [$NH_4H_2PO_4$] (Sigma).
- Ammoniaque (Carlo Erba Reagenti).
- Cartouches Bond Elute PBA (Varian).
- Colonne C18 en phase inverse TSKgel ODS-120T, 250 × 4,6 mm (Tosoh Bioscience).

Tous les réactifs étaient de qualité CLHP et les solutions ont été préparées dans de l'eau de qualité CLHP.

VI.2.2 Appareillages

VI.2.2.1 Chromatographie Liquide Haute performance

Le système de CLHP était constitué d'un dégazeur à vide SCM1000 (Thermo-finningan) et d'une pompe à gradient SpectraSystem P1000XR (Thermo-finningan) munie d'une boucle d'injection de 20 µl. La colonne utilisée était thermostatée à 25°C à l'aide d'un contrôleur de température 560-CIL (Cluzeau Info Labo). Les effluents sont analysés avec un spectrophotomètre à double faisceau Spectrasystem UV1000, à longueur d'onde variable.

L'acquisition des données est réalisée à partir du logiciel Azur version 4.6 (Datalys).

VI.2.2.2 Extraction en phase solide

Les cartouches Bond Elute PBA sont fixées sur un Buchner par l'intermédiaire d'un bouchon percé en caoutchouc (Figure 17). L'aspiration est réalisée à l'aide d'une pompe à palettes Varian DS 102.

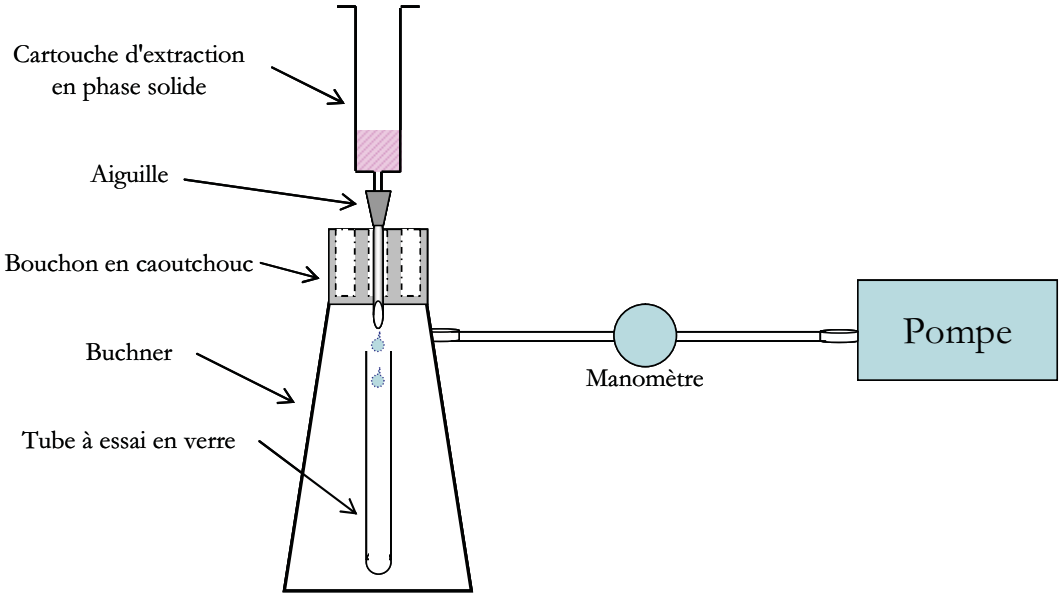


Figure 17. Montage des appareillages et verreries lors de l'extraction en phase solide

VI.2.2.3 Lyophilisateur

– Lyophilisateur de laboratoire, Cryodos Telstar (Terrassa), associé à une pompe à palettes Varian DS 102.

Les échantillons, congelés manuellement dans de l'azote liquide, sont branchés sur l'une des huit valves du lyophilisateur lorsque la pression est à 0,300 mBar et que la température interne est descendue à -80°C.

VII. METHODES

VII.1 ETUDE *IN VIVO* DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE DES COMPLEXES

VII.1.1 Préparation des complexes

Les solutions de ribavirine et de cyclodextrine ont été préparées par dissolution dans de l'eau pour préparation injectable et stérilisées par filtration à travers un filtre millipore de 0,22 µm. Les complexes ribavirine/alpha-cyclodextrine et ribavirine/bêta-cyclodextrine ont été préparés au rapport molaire 1:3 et 1:1, respectivement, dans de l'eau pour préparation injectable selon les conditions précédemment décrites par Higucchi et Connors [Higuchi & Connors, 1965], c'est-à-dire sous agitation pendant 24h à température ambiante. Chaque complexe est exprimé en fonction de la quantité de ribavirine complexée.

VII.1.2 Entretien des animaux

Les souris CBA/ca, males et femelles, sont élevées dans des cages en plastique sous lumière naturelle dans une atmosphère à la température et à l'humidité contrôlées (19°C et 44 à 45% d'humidité). La nourriture et la boisson sont fournies à volonté. Les souris infectées et saines sont hébergées dans des pièces différentes.

VII.1.3 Inoculation

Les souris CBA/ca ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de 50 µl d'une solution contenant 6,25 mg/ml de kétamine, 6,25 mg/ml de xylazine et 0,25 mg/ml d'atropine.

L'inoculation intracrânienne est réalisée dans la fontanelle droite de la souris avec une seringue à insuline et une aiguille de 0,33×12,7 mm. Un joint de seringue enfilé sur l'aiguille sert de butoir et permet une injection standardisée à une profondeur de 5 mm. Chaque souris est inoculée avec 1000 UFP de la souche CAM/RB du virus de la rougeole, soit 30 µl d'une solution du pool de virus initial, dilué dans du PBS en fonction du résultat du titrage viral.

VII.1.4 Traitement

Les souris sont pesées et traitées quotidiennement par injection intrapéritonéale d'une solution de ribavirine (40 mg/kg) libre ou complexée à l'alpha- ou la bêta-cyclodextrine ou d'eau pour préparation injectable (10 µl/kg).

VII.1.5 Détermination de la dose létale 50 de la ribavirine, de l'alpha- et la bêta-cyclodextrine et des complexes ribavirine/alpha-cyclodextrine et ribavirine/bêta-cyclodextrine

La dose létale 50 (DL_{50}) de la ribavirine libre ou complexée à l'alpha- ou la bêta-cyclodextrine et des cyclodextrines alpha et bêta seules a été déterminée en utilisant des groupes de 5 à 7 souris CBA/ca âgées de 3 à 4 semaines. Chaque animal reçoit une dose unique de l'un des traitements. Les doses testées vont de 20 à 480 mg/kg pour la ribavirine libre, 486 à 2916 mg/kg et 250 à 750 mg/kg pour l'alpha- et la bêta-cyclodextrine respectivement et de 30 à 80 mg/kg et 10 à 150 mg/kg pour les complexes ribavirine/alpha-cyclodextrine et ribavirine/bêta-cyclodextrine respectivement.

VII.1.6 Détermination de la charge virale

VII.1.6.1 Extraction de l'ARN

La souris est euthanasiée par dislocation cervicale. Le cerveau est prélevé puis pesé. Il est homogénéisé dans 2 ml de TRizol® par passages répétés à travers une aiguille 25G. L'homogénat obtenu est laissé en contact 5 minutes à température ambiante. Il est ensuite additionné de 0,4 ml de chloroforme. Après 15 secondes d'agitation vigoureuse puis 3 minutes d'attente à température ambiante, le mélange est centrifugé à 12 000 g, 15 minutes à 4°C. Après la centrifugation, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube dans

lequel 0,5 ml d'isopropanol est ajouté. L'échantillon est incubé 10 minutes à température ambiante puis centrifugé à 12000 g, 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est lavé dans 1 ml d'éthanol à 70% v/v à 4°C. Apres agitation, l'échantillon est centrifugé à 7500 g, 5 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est séché à l'air libre 5 minutes puis dissout par incubation 10 minutes à 56°C dans un volume final de 200 µl d'eau distillée sans RNase. La pureté et la concentration de l'ARN total sont estimées par spectrophotométrie UV. La concentration est ajustée à 50 ng/µl, sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm (1 cm de trajet optique) correspond à 40 µg/mL d'ARN. La qualité de l'ARN est vérifiée par un gel d'électrophorèse conventionnel.

VII.1.6.2 Quantification du génome du gène N du virus de la rougeole

La charge virale dans le cerveau des souris a tout d'abord été quantifiée par RT-PCR quantitative en méthode SYBR Green, comme cela avait été réalisé au cours des études préliminaires [Grancher, 2005]. Puis, afin d'améliorer la sensibilité, les échantillons ont été re-quantifiés par RT-PCR quantitative en méthode TaqMan. Seuls les résultats obtenus par Méthode TaqMan sont présentés.

Le gène de la nucléoprotéine du virus de la rougeole a été détecté par RT-PCR quantitative TaqMan en deux étapes selon la méthode décrite par Uhlmann [Uhlmann et al., 2002]. La production de l'ADN complémentaire du brin négatif a été réalisée à 48°C pendant 30 minutes à partir de 10 µl d'ARN, ajoutés à 50 U de reverse transcriptase, 40 U d'inhibiteur de RNAse et 0,8 µM d'amorce antisens dans un volume réactionnel total de 25 µl contenant 50 mM de Tris HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl2, 10 mM de DTT et 0,6 mM de dNTPs.

L'amplification de l'ADN complémentaire du gène N par PCR a été réalisée à l'aide du Master MIX TAQ 2X à partir de 10 µl du produit de la reverse transcription, en présence de 0,2 µM d'amorces sens et antisens et de 0,1 µM de la sonde TaqMan. Les conditions expérimentales étaient 95°C pendant 10 min pour l'activation, 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C sur l'automate ABI Prism 7000. La quantification a été réalisée à l'aide de la gamme standard d'ADNc du gène N. Les données ont été analysées à partir du logiciel ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Préparation de la gamme standard : le cDNA obtenu après amplification du gène N de la souche CAM/RB du virus de la rougeole par RT-PCR a été cloné dans le vecteur PCR® 4-TOPO® à l'aide du kit TOPO TA Cloning® Kit for sequencing (Invitrogen) en suivant les

instructions du fournisseur, puis le plasmide a été linéarisé, purifié et transcrit en ARN. Le cDNA obtenu ensuite par transcriptase inverse (selon le protocole précédemment décrit) a été quantifié puis dilué en cascade afin de préparer la gamme de quantification.

VII.1.6.3 Quantification du gène de "ménage" comme standard interne

Les ARNm de la glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogenase (GAPDH) murine ont été recherchées par RT-PCR dans tous les échantillons d'ARN extraits des cerveaux de souris. La transcription inverse a été réalisée à 37°C pendant 60 minutes puis 98°C pendant 10 minutes à partir de 10 µl d'ARN total et dans un volume réactionnel de 25 µl. Le mélange réactionnel utilisé est le même que celui de la transcriptase inverse pour le gène N du virus de la rougeole avec l'amorce antisens spécifique.

L'ADNc obtenu a été amplifié à l'aide du PCR SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), contenant 0,2 µM d'amorces sens et antisens. Dix microlitres d'ADNc sont amplifiés par PCR dans un volume réactionnel total de 50 µl au cours de la PCR réalisée sur l'automate ABI Prism 7000 (Applied Biosystems), selon les conditions précédemment décrites.

VII.1.7 Protocole d'évaluation de l'activité antivirale

Les souris sont traitées à partir du jour J-1, avant l'inoculation du virus de la rougeole, avec de l'eau (comme témoin négatif), de la ribavirine (40 mg/kg), le complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine (1 :3) ou le complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine (1 :1) à 40 mg/kg de ribavirine chacun. Le traitement a été réalisé de façon quotidienne jusqu'à la fin de l'expérience.

L'évolution de l'infection a été suivie en quantifiant la charge virale dans le cerveau des souris du jour J2 au jour J6 suivant l'inoculation. Trois souris au minimum ont été utilisées pour chaque traitement et chaque jour.

L'impact du traitement sur la morbidité et la mortalité a été évalué par enregistrement des pesées quotidiennes des animaux et leur durée de survie. Quinze souris par groupe ont été utilisées pour ces études.

VII.2 ETUDE PHARMACOCINETIQUE DU COMPLEXE

VII.2.1 Préparation de l'échantillon pour l'extraction en phase solide

Le cerveau est prélevé chez l'animal euthanasié par dislocation cérébrale. Il est broyé mécaniquement par passage au travers d'une aiguille 25G, dans 1 ml d'eau pour préparation injectable. Vingt cinq microlitres d'une solution de 3-méthylcytidine méthosulfate à 100 ng/µl sont ajoutés à l'échantillon en tant que standard interne au broyat de cerveau. L'homogénat obtenu est ensuite centrifugé 3 minutes à 20 000 g, dans une centrifugeuse réfrigérée à +4°C. La totalité du surnageant obtenu est prélevée et neutralisée par 3 ml d'une solution d'acétate d'ammonium [250 mM], à pH = 8,5.

VII.2.2 Extraction en phase solide

La ribavirine est extraite à partir des broyats de cerveau à l'aide d'une technique d'extraction en phase solide au cours de laquelle la molécule à purifier est fixée de façon spécifique sur une cartouche puis éluée après élimination des contaminants.

La cartouche d'extraction en phase solide "Bond Elute PBA" est prétraitée avec 1 ml d'acide formique à 100 mM puis avec 5 ml d'acétate d'ammonium [250 mM], (pH 8,5). L'échantillon broyé, centrifugé et neutralisé est déposé sur la cartouche prétraitée et passe à travers la cartouche sous l'effet d'une aspiration sous vide contrôlé, l'éluât s'écoulant au goutte à goutte. Le passage de l'échantillon et la fixation de la ribavirine et du standard interne sont suivis d'une étape d'aspiration sous vide (ouverture du manomètre au maximum, P = 250 mBar) de 5 minutes (Figure 18).



Figure 18. Extraction de la ribavirine à partir de broyat de cerveaux : fixation sur la cartouche et élution des composés indésirables

La ribavirine et le standard interne sont élués par passage de 2 fois 1 ml d'acide formique [100mM] sous dépression contrôlée (au goutte à goutte). L'éluât est récupéré dans un tube en verre de 5 ml. Chaque passage de 1 ml d'acide formique est suivi d'une aspiration sous vide forcé (manomètre ouvert au maximum, P = 250mBar) de 5 minutes chacune. L'échantillon ainsi obtenu est lyophilisé après congélation dans de l'azote liquide, jusqu'à évaporation complète du véhicule (Figure 19). Le lyophilisat est conservé sec à +4°C jusqu'à reconstitution et injection immédiate pour dosage en CLHP.



Figure 19. Extraction de la ribavirine à partir de broyats de cerveaux : élution de la ribavirine fixée sur la cartouche et lyophilisation de l'éluât

VII.2.3 Chromatographie liquide haute performance

La phase mobile est constituée d'une solution aqueuse de phosphate d'ammonium (0,087 M, pH 6,5). Le débit est réglé à 1 ml/min.

Vingt microlitres de l'échantillon à analyser, reconstitués dans une solution de phase mobile, sont injectés sur la colonne après rinçage de la seringue et de la boucle d'injection avec 60 µl de l'échantillon.

VII.2.4 Réalisation d'une gamme de quantification *ex vivo*

La gamme de quantification *ex vivo* a été réalisée à partir de la solution mère de ribavirine à 40 mM. Les échantillons de référence, contenant 2, 4, 8, 12, 18, 24, 30 nmol de ribavirine par cerveau, ont été préparés par broyage d'un cerveau de souris non traitée dans 1 ml de solution diluée de ribavirine. La ribavirine a été extraite après ajout de standard interne et traitement de l'échantillon par extraction en phase solide selon le protocole précédemment décrit. Après dosage de la ribavirine par CLHP, la courbe de calibration a été réalisée en associant le rapport de l'aire sous la courbe du pic de ribavirine rapporté à l'aire sous la courbe du pic de standard interne, à la quantité de ribavirine ajoutée dans le cerveau.

VII.2.5 Détermination de la pharmacocinétique de la ribavirine dans le cerveau

Les techniques de maintien des animaux, de traitement par la ribavirine libre ou complexée et d'inoculation intracérébrale du virus de la rougeole sont celles utilisées pour la détermination de l'activité antivirale du complexe et décrites précédemment (§ VII.1).

VII.2.5.1 Administration d'une dose unique chez la souris saine

La souris est traitée soit par une dose unique de ribavirine à 40, 100 ou 200 mg/kg de ribavirine libre, soit par une dose unique du complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine à 40 ou 100 mg/kg en ribavirine. La ribavirine est recherchée dans le cerveau à t=30 minutes, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h ou 48h après l'injection.

VII.2.5.2 Administration d'une dose unique chez la souris infectée

Au jour J3 après l'inoculation intracérébrale du virus de la rougeole, la souris est traitée par une dose unique de ribavirine libre ou complexée à 40 mg/kg. La ribavirine est recherchée dans le cerveau à t=30 minutes, 1, 2, 3, 4, 5, 6, ou 24 h après l'injection.

VII.2.5.3 Administration de doses cumulées chez la souris infectée

La souris est traitée quotidiennement par 40 mg/kg de ribavirine libre ou complexée, à partir du jour J-1 et inoculée par voie intracérébrale par le virus de la rougeole au jour J0. La ribavirine est recherchée dans le cerveau au jour J6, à t=3 et 5 h après la dernière injection.

Chaque point est réalisé au minimum sur trois souris.

RESULTATS ET DISCUSSION

VIII. ACTIVITE ANTIVIRALE *IN VIVO*

VIII.1 DEMARCHE EXPERIMENTALE

La mise au point du modèle animal, initiée par le docteur N. Grancher [Grancher, 2005], reposait sur l'utilisation de souris CBA/ca sensibles au virus de la rougeole et d'une souche neurovirulente du virus (CAM/RB). La répétabilité du modèle animal a été optimisée en utilisant des souris consanguines, âgées de trois à quatre semaines. Cet âge assure la sensibilité à l'inoculation virale qui diminue chez la souris adulte, et permet d'utiliser des souriceaux sevrés, éliminant ainsi le risque de cannibalisme par les mères des souriceaux. Des études de détermination de la DL_{50} du virus de la rougeole et des molécules utilisées, seules ou complexées, ont précédé l'étude de l'activité antivirale *in vivo*. Le développement de l'infection a été contrôlé par des méthodes immunohistochimiques.

L'inoculation intracérébrale a été validée en calibrant la longueur de l'aiguille utilisée à l'aide d'un joint de seringue à insuline enfilé sur l'aiguille, limitant ainsi la profondeur de pénétration de l'aiguille dans le cerveau de l'animal.

Le pré-traitement de l'animal, un jour avant l'inoculation intracérébrale, permet d'optimiser l'efficacité antivirale du composé testé et de se replacer dans le contexte d'encéphalite rougeoleuse qui est une complication secondaire de l'infection primaire par le virus de la rougeole.

VIII.2 PROBLEMES RENCONTRES

En dépit de la production de souriceaux à l'animalerie du laboratoire, la disponibilité d'animaux pour les expériences pose de nombreux problèmes techniques. La réalisation au cours d'une même série d'expériences sur plusieurs points avec différents traitements nécessite d'avoir un nombre suffisant de souriceaux, du même âge, en même temps. L'utilisation de souris CBA/ca consanguines n'élimine pas tous les problèmes de reproductibilité. En effet, le taux d'infection par le virus, sa cinétique d'évolution et l'apparition des signes cliniques chez l'animal sont influencés par le poids de la souris au moment de l'expérience, donc indirectement par le nombre de souriceaux présents dans la portée et l'âge de la femelle gestante. Tous ces paramètres sont difficilement contrôlables.

Cette variabilité a entraîné la nécessité d'un grand nombre de répétitions des expériences pour arriver à un résultat statistiquement interprétable.

VIII.3 RESUME DE L'ARTICLE

VIII.3.1 Complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine

La ribavirine est un analogue de la guanosine présentant *in vitro* une activité antivirale à large spectre contre de nombreux virus à ADN ou à ARN. Elle est notamment efficace sur le virus de la rougeole, mais peu utilisée au cours des complications cliniques neurologiques secondaires à l'infection par ce virus en raison de sa faible biodisponibilité. En effet, l'administration de ribavirine par voie intrapéritonéale, sous-cutanée ou intramusculaire est inefficace pour traiter des souris inoculées par voie intracérébrale, suggérant une incapacité de la ribavirine à traverser la BHE [Bussereau et al., 1988; Sidwell et al., 1973]. Puisque les cyclodextrines sont capables d'améliorer la perméabilité d'une monocouche de cellules caco-2 [Hovgaard & Brondsted, 1995] et que ce modèle cellulaire de membrane permet de prédire la perméabilité de molécules à travers la BHE [Lohmann et al., 2002], nous avons étudié ces vecteurs pour améliorer la biodisponibilité de la ribavirine au niveau cérébral.

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques possédant une cavité hydrophobe. La réalité des complexes ribavirine/cyclodextrine a été démontrée par des études de physicochimie. Il a également été prouvé que l'activité antivirale, dirigée contre le virus de la rougeole, de la ribavirine au sein du complexe ribavirine/cyclodextrine est augmentée *in vitro*. Dans le but d'évaluer le bénéfice de cette complexation *in vivo*, nous avons développé un modèle d'encéphalite avec une souche neuroadaptée du virus de la rougeole (CAM/RB) chez la souris CBA/ca âgée de trois à quatre semaines (DL50 évaluée à 212,7 UFP). Les souris sont traitées soit avec de la ribavirine seule, soit avec le complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine au rapport molaire 1:3. Les doses létales 50 de chaque molécule et du complexe ont été déterminées chez la souris saine. La DL_{50} calculée pour l'alpha-cyclodextrine (850 mg/kg) est proche de celles décrites chez la souris (842–1070 mg/kg) ou chez le rat (788 mg/kg) [Frank et al., 1976; Uekama & Otagiri, 1987].

Pour la détermination de l'activité antivirale, le traitement a été administré par voie intrapéritonéale quotidiennement (de J-1 à J6) à raison de 40 mg/kg de ribavirine. Les souris sont inoculées par voie intracrânienne avec 1000 UFP de souche neurovirulente CAM/RB au jour J0. La cinétique de l'infection et l'établissement de l'encéphalite rougeoleuse ont été

suivies par détermination de la charge virale du virus de la rougeole dans le cerveau, du jour J2 au jour J6 après l'inoculation, par une technique de reverse transcription - réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) quantitative en méthode TaqMan en deux étapes. Une gamme étalon externe a permis la quantification du virus de la rougeole. Cette gamme a été réalisée à partir d'un transcrit ARN issu d'un plasmide (vector PCR®-4 TOPO) recombiné contenant un fragment du gène N du virus. Une transcription inverse sur le transcrit ARN est effectuée afin d'obtenir du cDNA. La gamme étalon est réalisée à partir d'une dilution du cDNA. Les résultats montrent une augmentation de la charge virale du jour J2 au jour J6 après inoculation et une diminution de la charge virale du virus de la rougeole dans le cerveau au cours du traitement par le complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine (1:3) d'environ 0,6 $\log_{10}$ Eq. copies/ml à J6.

L'activité antivirale a été évaluée en suivant la morbidité par l'intermédiaire de l'évolution du poids des souris contrôles (traitées par de l'eau distillée) ou traitées par la ribavirine seule ou le complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine. La mortalité a également été déterminée dans les trois groupes d'animaux. Au jour J21, l'inoculation intracérébrale du virus de la rougeole entraîne 100% de mortalité dans le groupe contrôle, 80% et 40% de mortalité dans les groupes ribavirine et complexe respectivement. Par ailleurs, parmi les souris survivantes, seules les souris traitées par le complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine continuent à prendre du poids après l'inoculation intracérébrale par le virus de la rougeole.

Ainsi, la ribavirine à 40 mg/kg n'est efficace sur notre modèle animal d'encéphalite rougeoleuse que si elle est administrée sous la forme d'un complexe avec l'alpha-cyclodextrine. La ribavirine seule n'apporte pas de bénéficie significatif par rapport à l'eau distillée, comme cela avait été démontré chez le hamster traité par 50 mg/kg de ribavirine libre [Honda et al., 1994].

Le rôle de l'alpha-cyclodextrine dans l'amélioration de l'activité antivirale de la ribavirine au sein du complexe devra être confirmé ultérieurement par des études pharmacocinétiques de la ribavirine dans le cerveau des souris CBA/ca infectées, tel que cela a été réalisé chez la souris ou le hamster [Gilbert et al., 1991; Ishii et al., 1996].

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
International Journal of Pharmaceutics 357 (2008) 148–153
INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS
www.elsevier.com/locate/ijpharm

In vivo antiviral activity of ribavirin/alpha-cyclodextrin complex: Evaluation on experimental measles virus encephalitis in mice

H. Jeulin [a,b,*], N. Grancher [a], F. Kedzierewicz [b], C. Finance [b], A.E. Le Faou [a,1], V. Venard [a]

[a] *GEVSM-SRSMC-UMR 7565 CNRS/Nancy Université, Faculté de Médecine, Laboratoire de Virologie, 9 Avenue Forêt de Haye, B.P. 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France*
[b] *GEVSM-SRSMC-UMR 7565 CNRS/Nancy Université, Faculté de pharmacie, 5, rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France*

Received 28 September 2007; received in revised form 18 January 2008; accepted 25 January 2008
Available online 3 February 2008

Abstract

Intracranial injection of the rodent adapted CAM/RB strain of measles virus (MV) induces encephalitis in CBA/ca mice. It has already been shown that cyclodextrins can be used as carriers to increase the antiviral activity of ribavirin (RBV) against MV in cellular model. In this study, the antiviral activity of a RBV/α-cyclodextrin complex has been evaluated *in vivo* using the above model. CBA/ca mice were treated by intraperitoneal injection of free ribavirin (40 mg/kg) or a RBV/α-cyclodextrin complex (molar ratio 1:3). After 21 days, intracerebral injection of CAM/RB resulted in 100% mortality in the mock group. In contrast, mortality rates of 80% and 40%, respectively, were observed in RBV and RBV/α-CD-treated mice ($p < 0.05$ and $p = 0.06$ for distilled water and RBV, respectively). The viral load of MV in the mouse brain was monitored daily by real-time PCR until day 6 after infection, to compare virus production in treated and non-treated mice. This data shows that RBV complexation with α-cyclodextrin can increase the antiviral activity of ribavirin in a measles virus encephalitis model in mice.
© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Measles virus; Encephalitis; Ribavirin; Cyclodextrin; RT-PCR; Survival rate

1. Introduction

Measles virus (MV) is responsible for a common childhood disease, which can be complicated in 10% of cases by otitis, pneumonia, diarrhea and encephalitis (Schneider-Schaulies and ter Meulen, 2002). Despite massive immunization campaigns, about 30 million measles virus infections have resulted in 530,000 deaths in 2003 (Muller et al., 2007). No chemotherapeutic agent is currently approved for the prophylactic or therapeutic treatment of measles. Ribavirin (RBV), a broad-spectrum antiviral agent, presents *in vitro* activity against numerous viruses including MV (Huffman et al., 1973). It has been reported that patients with severe measles infections may benefit from intravenous RBV injection (Forni et al., 1994). Antiviral activity of RBV against MV has already been assessed in hispid cotton rats, infected by either aerosol or intraperitoneal route (Wyde et al., 2000) and in hamsters after intracranial injection (Honda et al., 1994). However, intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular injection of RBV was ineffective in mice inoculated intracerebrally with either rabies or Herpes Simplex Virus type 1, suggesting a failure of RBV to cross the blood–brain barrier (Bussereau et al., 1988; Sidwell et al., 1973) and to treat ribavirin-sensitive viral encephalitis.

Since cyclodextrins (CDs) have been proven to be permeation enhancers on caco-2 cell monolayer as an intestinal model (Hovgaard and Brondsted, 1995) and as caco-2 cell monolayer has already been used to predict permeability for a drug towards the blood–brain barrier (Lohmann et al., 2002), CDs could be used as permeation enhancers on the blood–brain barrier. The most common native CDs are α-, β- or γ-CD constituted by 6, 7 or 8 α-1,4-linked glucopyranose units, respectively. They are cyclic oligosaccharides with a hydrophobic central cavity which can form complexes with numerous molecules, and improve their bioavailability and their biological properties (Zhang and Rees, 1999).

* Corresponding author at: Laboratoire de virologie CHU de Nancy Brabois, Route de Neufchâteau, 54511 Vandoeuvre les Nancy, France.
Tel.: +33 3 83153468; fax: +33 3 83153474.
E-mail addresses: helene.jeulin@pharma.uhp-nancy.fr, h.jeulin@chu-nancy.fr (H. Jeulin).
[1] Present address: Laboratoire de Virologie, Institut Pasteur de Bangui, rue Pasteur, B.P. 923, Bangui, Central African Republic.

0378-5173/$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijpharm.2008.01.043

In the case of RBV, cyclodextrin interest does not focus on dissolution rate improvement because of high solubility on an aqueous medium. It focuses rather on antiviral drug access to the brain enhancement. After Grancher et al. (2005) proved the existence of a 1:1 complex between ribavirin and α-, β- and γ-CD by physicochemical studies, the authors demonstrated that RBV/α-CD and RBV/β-CD complexes increase RBV activity against MV *in vitro* (Grancher et al., 2004).

In the present work, we describe the first *in vivo* evaluation of an antiviral drug/cyclodextrin complex on central nervous system infection. After development of MV intracerebral inoculation and determination of lethal dose 50 (LD50) of free or complexed RBV and α-CD, RBV/α-CD complex was tested in an experimental measles virus encephalitis model using CBA/ca mice infected with the rodent adapted CAM/RB strain of MV (Niewiesk et al., 1993).

2. Materials and methods

2.1. Virus

A working stock of the rodent brain-adapted CAM/RB strain (kindly provided by Prof Liebert, Leipzig, Germany) was prepared in phosphate-buffered saline (PBS), from the brain homogenates of 5-day-old CBA/ca mice, 3 days after intracerebral injection. The same homogenate was used for all *in vivo* experiments. The virus titer (7.40 $\log_{10}$ Eq. PFU/ml) was determined by limit dilution (Wyshak and Detre, 1972).

2.2. Animals

CBA/ca mice of either sex (weight range 10–14.5 g at experimental onset) from B&K Universal (East Yorkshire, England) were maintained in plastic cages under natural light cycle at 19 °C and 44–45% humidity. Food and water were provided *ad libitum*. All local legal and ethical requirements were observed. MV infected and control animals were housed in separate rooms.

2.3. Intracerebral MV challenge

On day 0, 3–4-week-old CBA/ca mice were anesthetized by intraperitoneal administration of 50 μl of a solution containing 6.25 mg/ml ketamine, 6.25 mg/ml xylazine and 0.25 mg/ml atropine. Afterwards, 1×10^3 PFU of MV CAM/RB (5× LD50) in 30 μl PBS were injected into the right temporal fontanel using an insulin syringe and a 0.33 mm × 12.7 mm needle. A rubber septum threaded on the needle was used as a stopper to standardize the depth of penetration at 5 mm in the right hemisphere (confirmed by an i.c. methylene blue injection). Weight and clinical symptoms were registered daily for 15 days.

2.4. Lethal dose 50 of MV CAM/RB strain

The LD50 of MV CAM/RB was determined using 4 groups of eight 3–4-week-old mice inoculated with 10 to 10,000 PFU of MV CAM/RB in 30 μl of PBS. The LD50 was determined by interpolation after checking the mortality rate daily during 21 days. At the end of the experiment all mice were sacrificed.

2.5. Preparation of RBV/α-CD complexes

Both RBV (MP Biomedicals) and native α-CD (Wacker-Chemie GmbH) were dissolved in distilled water and sterilized by filtration through a 0.22 μm membrane. The RBV/α-CD complex was prepared at a molar ratio of 1:3 in distilled water as previously described (Grancher et al., 2004). Concentrations of RBV/α-CD solutions are expressed as RBV concentrations.

2.6. LD50 of RBV and RBV/α-CD complex

The LD50 of free or complexed RBV and α-CD were determined using groups of five to seven 3–4-week-old mice. Each animal received a single dose per treatment. Tested doses ranged between 486 and 2916 mg/kg, 20 and 480 mg/kg and 30 to 80 mg/kg, respectively, for α-CD, RBV and RBV/α-CD (1:3). The highest dose of RBV corresponded to its limit of solubility. LD50 was calculated as described above.

2.7. Treatment

Mice were weighed and treated once a day during 10 days by intraperitoneal injection of RBV (40 mg/kg), RBV/α-CD (1:3) complex (corresponding to 40 mg/kg of RBV) or distilled water from the day before challenge until the end of the experiment. Each treatment group contained 15 mice for mortality evaluation. The benefit of treatments was first estimated by checking the mortality and then by determining the viral load as described below.

2.8. RNA isolation from the brain

Groups of 29, 31 and 29 mice treated with RBV, RBV/α-CD and distilled water, respectively, were infected to monitor the viral load between day 2 and day 6. From days 2 to 6 after challenge, 3 to 10 mice per treatment group were sacrificed each day. Total RNA was isolated from whole brain using 2 ml TRIzol® reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Purity and concentration of total RNA were measured by UV spectrophotometry (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) and its concentration was adjusted to 0.5 μg/μl.

2.9. RNA quantification

MV-nucleoprotein (MV-NP) mRNA was detected by a two-step quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the primers and TaqMan probe® as described by Uhlmann et al. (2002). Minus strand synthesis of total cDNA was carried out at 48 °C for 30 min using 10 μl of RNA, 50 U multiscribe RT, 40 U RNAse inhibitor and 0.8 μM gene specific primer in a 25 μl reaction containing 50 mM Tris HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT and 0.6 mM dNTPs. Amplification of MV-NP cDNA by PCR was performed using PCR TaqMan Master Mix 2×, on 10 μl RT

product in the presence of 0.2 μM forward and reverse primers and 0.1 μM TaqMan probe. Cycling conditions were activation (95 °C, 10 min), 40 cycles of annealing (95 °C, 15 s) and amplification (60 °C, 1 min) using ABIPrism 7000 thermocycler. Absolute quantification was performed using a MV-NP cDNA standard and data analysis was performed using ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

2.10. Internal standard using house-keeping gene

The presence of murine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was determined in all RNA samples. The RT was performed for 60 min at 37 °C and 10 min at 98 °C with 10 μl of RNA in a total volume of 25 μl using the reaction mix described above and 0.8 μM of reverse primer (5′-CGT GGT TCA CAC CCA TCA CAA A-3′). Specific cDNA was amplified using PCR Syber Green Master Mix 2× (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) including 0.2 μM of forward primer (5′-AAT TCA ACG GCA CAG TCA AGG C-3′), 0.2 μM of reverse primer. 10 μl of cDNA sample was added for a total volume of 50 μl. The PCR was performed on an ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) using the conditions described above.

2.11. Preparation of the measles cDNA standard

The product of a conventional RT-PCR carried out on the N gene of the MV CAM/RB genomic RNA was subcloned into the vector pCR® 4-TOPO® using TOPO TA Cloning® Kit for sequencing (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following the manufacturer's instructions. Plasmid was linearized, purified and transcribed into RNA. The cDNA was obtained after RT step with reverse primer as described above. After quantification, serial dilution of measles cDNA standard was made in water.

2.12. Statistics

Mean virus titers of the treated and untreated groups were compared using Mann–Whitney nonparametric statistical test and survival-rate curve by nonparametric Kaplan Meier test.

3. Results

3.1. In vivo toxicity

The LD50s of α-CD, RBV and the RBV/α-CD (1:3) complex were determined after intraperitoneal injection in CBA/ca mice. RBV was devoid of any lethal effect even at the maximum dose (480 mg/kg). The LD50 of α-CD alone was 850 mg/kg. The LD50 of the RBV/α-CD (1:3) complex was 55 mg/kg of RBV and 657 mg/kg of α-CD. These findings enable mice to be treated with 40 mg/kg of free or complexed RBV.

3.2. Intracerebral infection with measles virus

Mice were challenged with 1000 PFU of MV CAM/RB, corresponding to about 5 times the LD50 (213 PFU per mouse) on day 0. Three groups of 15 mice treated during ten days (day-1 to day 8) with either distillated water, RBV and RBV/α-CD were used. From day 4 on, animals started to show encephalitis signs, including limb weakness, tremors, arched vertebral column and hyperactivity to different degrees. Mock-treated mice developed more overt symptoms and in a greater proportion (data not shown).

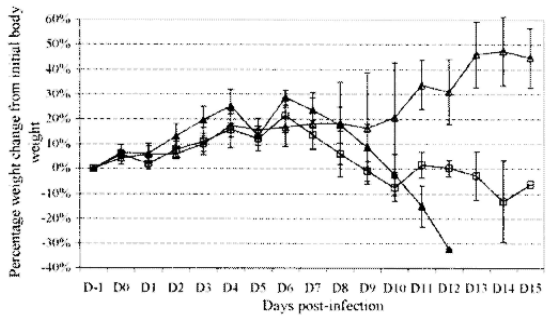


Fig. 1. Percentage weight change in CBA/ca mice intracranially injected with measles virus CAM/RB strain according to treatment with distillated water (▲), ribavirin (40 mg/kg) (□) and ribavirin/alpha-cyclodextrin complex (molar ratio 1:3; 40 mg/kg of ribavirin) (△).

Daily body-weight variation was determined as a marker of morbidity after virus-injection. For the first 7 days (day-1 to day 5), mice of all groups continued to thrive irrespective of the treatment (0.5 g/day on average), except after intracranial injection (day 1, day 2) where weight did not increase. From day 6 on, the weight of mock-treated mice continually decreased until day 12, whereas the weight of RBV-treated mice stayed unchanged until day 14, even for recovering animals. Only RBV/α-CD-treated surviving mice continued to gain weight (Fig. 1).

3.3. Effect of RBV and RBV/α-CD treatment

On day 21 mortality rates of 100, 80 and 40% were determined for the groups treated with distilled water, RBV and RBV/α-CD, respectively. Infected mice treated with distilled water died on days 8–12 post-infection. RBV-treated mice (40 mg/kg) have a mean death-time of 11.5 days (range 8–15 days) after virus injection (Fig. 2). The survival rate of RBV/α-CD-treated mice was significantly higher ($p < 0.05$) compared to mock-treated mice. Although more mice survived in the RBV/α-CD-treated group compared to RBV-treated group, the difference was not statistically significant ($p = 0.06$). Similarly, the difference in survival rates between RBV- and mock-treated mice was not significant ($p = 0.2$).

3.4. Measles viral load in the brain of infected mice

Virus infection was assessed by quantifying a significant increase in MV RNA copy numbers (range 6.8–8.8 $\log_{10}$ Eq. copies/ml) between days 2 and 5 in all treatment groups (Table 1). Between days 5 and 6, the viral load further increased in the mock- and RBV-treated groups, and slightly decreased in the RBV/α-CD-treated group. Thus,

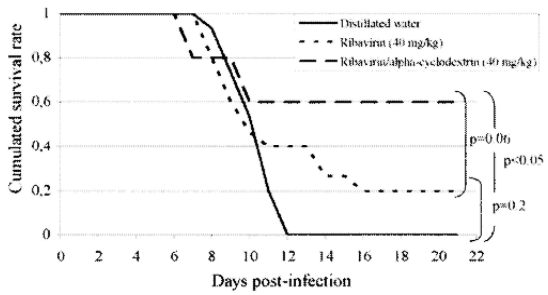


Fig. 2. Survival rates after intracranial challenge of CBA/ca mice with measles virus CAM/RB according to treatment with distilled water, ribavirin (40 mg/kg), ribavirin/alpha-cyclodextrin complex (molar ratio 1:3; 40 mg/kg ribavirin). 15 animals per group.

on day 6, the viral load was significantly lower (minus 0.60 $\log_{10}$ Eq. copies/ml) in the RBV/α-CD-treated group compared to RBV- and mock-treated groups ($p = 0.02$ and 0.04).

4. Discussion

RBV has an antiviral activity against MV replication both *in vitro* (Huffman et al., 1973) and *in vivo* (Forni et al., 1994). Although conflicting results about its clinical efficiency have been reported: in measles pneumonitis and encephalitis in children treated for malignant disease, RBV treatment was not clearly effective (Kernahan et al., 1987). It is thought that RBV does not cross the blood–brain barrier (Morrey et al., 2002; Sidwell et al., 1973) most probably because of its low lipid solubility, which led to CD evaluation as a drug carrier towards the blood–brain barrier.

Determination of the complex antiviral activity necessitated *in vivo* toxicity evaluation on mice. The LD50 of α-cyclodextrin in CBA/ca mice after intraperitoneal injection is closely related to those obtained after intravenous injection in mice (LD50 of 842–1070 mg/kg) and in rats (LD50 of 788 mg/kg) (Frank et al., 1976; Uekama and Otagiri, 1987). The complex ribavirin/α-cyclodextrin at molar ratio 1:3 is more toxic than both molecules alone at the same dose and than the complex ribavirin/β-cyclodextrin at molar ratio 1:1 (Jeulin et al., 2006). Behaviour of cyclodextrins on an *in vitro* model of blood–brain barrier has been described and the threshold of toxicity was 1 mM for native α-cyclodextrin, explained by efflux of phosphatidylcholine, sphyngomyelin and cholesterol (Monnaert et al., 2004). *In vivo* α-cyclodextrin concentration in the blood–brain barrier could not be evaluated in our model, but the slight removal of cholesterol may result in an increase in membrane fluidity and explain both toxicity and antiviral activity improvement. Alpha-cyclodextrin toxicity on the blood–brain barrier could be reduced by using α-cyclodextrin derivatives (Monnaert et al., 2004). For example, sulfated amphiphilic α-, β- and γ-cyclodetxrin are in the course of development for complexation with another antiviral molecule, acyclovir (Dubes et al., 2003). Data of antiviral activity has not yet been published.

We have previously demonstrated that the complex RBV/α-CD enhances the antiviral activity of RBV on MV *in vitro* (Grancher et al., 2004). Here, for the *in vivo* antiviral activity evaluation, we have chosen weaning CBA/ca mice (3–4-week-old) susceptible to rodent brain adapted and neurovirulent measles CAM/RB strain (Niewiesk et al., 1993). In this model, the susceptibility of MV is age related (Griffin et al., 1974). Inoculation of 3–4-week-old mice with CAM/RB strain requires a significantly higher LD50 (212.7 PFU versus 27 PFU) than for 1–2-day-old CBA mice using Edmonston strain (Neighbour et al., 1978). A higher virus dose injection on older mice was preferred because of frequent cannibalism of 1–2-day-old MV infected mice by their mother, observed in pilot experiments. To avoid any influence of age on the results, mice from the same litter were randomly distributed between the different time and treatment points. Increasing measles viral load from day 2 to day 6 indicated an active infection in the brain. Clinical signs of infection were first apparent 4 days after inoculation and infected mice exhibited some growth retardation when compared with control mice as previously described by Neighbour et al. (1978). After day 6 the mortality of mock- and RBV-treated mice did not allow us any comparison between the 3 groups of animals.

Survival rates, used to evaluate the therapeutic effect of the treatment, showed a significant improvement ($p < 0.05$) for treatment by the complex at a dose of 40 mg/kg per day (60% survival of infected mice 21 days after MV virus injection). Thus the same dose of RBV had an effect only if complexed with α-CD. This is in agreement with Honda's results showing no efficacy

Table 1
Comparison of the effects of intraperitoneal treatment with distilled water, ribavirin (RBV) and ribavirin/α-cyclodextrin (RBV/α-CD) at molar ratio 1:3 on a measles virus encephalitis model in mice

Treatment	Mean of virus titer ($\log_{10}$ Eq. copies/ml) ± standard deviation and GADPH load ($\log_{10}$ Eq. copies/ml)				
	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Distilled Water (10 μL)	6.80 ± 0.2 ($n = 3$)	7.44 ± 0.14 ($n = 3$)	8.10 ± 1.00 ($n = 9$)	8.30 ± 0.20 ($n = 6$)	9.10 ± 0.12 ($n = 8$)
GADPH	5.86	5.92	5.78	5.86	5.80
Ribavirin (40 mg/kg)	6.80 ± 0.33 ($n = 3$)	7.00 ± 0.19 ($n = 3$)	7.66 ± 0.13 ($n = 9$)	8.80 ± 1.00 ($n = 6$)	9.10 ± 0.80 ($n = 10$)
GADPH	5.99	5.94	5.92	5.77	5.76
RBV/α-CD (1:3) (40 mg/kg of RBV)	7.10 ± 0.11 ($n = 3$)	6.80 ± 0.03 ($n = 3$)	7.99 ± 0.17 ($n = 8$)	8.54 ± 0.4 ($n = 6$)	8.48 ± 0.20 ($n = 9$)
GADPH	5.84	5.72	5.83	5.92	5.75

n: number of mice in each group. GADPH load was used as an internal standard.

of free RBV in measles infected hamsters, when administered intraperitoneally at the dose of 50 mg/kg/day (Honda et al., 1994).

Our results thus indicate that the *in vivo* antiviral effect of RBV relies on its combination with α-CD. A previous study using the complex ribavirin/β-cyclodextrin (1:1) indicated no significant improvement of antiviral activity *in vivo* (Jeulin et al., 2006), in accordance with the *in vitro* results (Grancher et al., 2004), whereas β-cyclodextrin showed the best interaction with ribavirin regarding its higher stability constant (Grancher et al., 2005).

Other carriers of RBV have already been studied *in vivo*, for instance the lipophilic dihydropyridine (DHP)-hydrophilic pyridinium in a murine model with Japanese encephalitis virus (Prokai et al., 2000) with slight efficacy (40–50% survival). Liposomal encapsulated RBV was more efficiency than free RBV in treatment of mice infected with Rift Valley fever, influenza or herpes simplex viruses (Gangemi et al., 1987; Kende et al., 1985). Moreover positive results were obtained after intrathecal injection of RBV which avoids problems of brain accessibility but is obviously not routinely practical (Honda et al., 1994; Hosoya et al., 2004). The improved efficiency of RBV/α-CD complex *in vivo* could be explained by an enhancement of the passage through the blood–brain barrier. Thus it remains to be determined if the penetration of RBV is enhanced because of an alteration of the blood–brain barrier or to a facilitated transport. One other possibility is that the RBV/α-CD complex is significantly more stable than RBV alone and accumulates in the brain over time because of its slow clearance (Gilbert and Wyde, 1988). This needs to be examined more closely by monitoring RBV concentration into the brain by high performance liquid chromatography, as has been described in mice and hamsters (Gilbert et al., 1991; Ishii et al., 1996).

In conclusion, the antiviral activity of RBV was only effective when administered after complexation with α-CD. The lower viral load in the RBV/α-CD-treated group compared to the RBV alone treated group further indicates that the complexation of RBV with α-CD increases its bioavailability, and thus its antiviral effect in the brain. No measles viral load was found in recovered animals (day 21).

The CBA/ca mice model described herein is the first study of vectorisation of RBV on the measles infection and the first *in vivo* evaluation of an antiviral activity of RBV/α-CD complex. It will provide opportunities to test other compounds for treatment of measles or other viral encephalitis.

Acknowledgements

We are grateful to Claude P. Muller and Jacques Kremer (Institute of Immunology and WHO Collaborative Center for Measles and WHO European Regional Reference Laboratory for Measles and Rubella) for helpful discussions in preparation of this manuscript and for editorial assistance. We also thank Jon Turner and Laetitia Pelascini for GADPH PCR. And we would like to thank Mrs. Marshall for editing the English of this manuscript.

References

Bussereau, F., Picard, M., Blancou, J., Sureau, P., 1988. Treatment of rabies in mice and foxes with antiviral compounds. Acta Virol. 32, 33–49.

Dubes, A., Degobert, G., Fessi, H., Parrot-Lopez, H., 2003. Synthesis and characterisation of sulfated amphiphilic alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins: application to the complexation of acyclovir. Carbohydr. Res. 338, 2185–2193.

Forni, A.L., Schluger, N.W., Roberts, R.B., 1994. Severe measles pneumonitis in adults: evaluation of clinical characteristics and therapy with intravenous ribavirin. Clin. Infect. Dis. 19, 454–462.

Frank, D.W., Gray, J.E., Weaver, R.N., 1976. Cyclodextrin nephrosis in the rat. Am. J. Pathol. 83, 367–382.

Gangemi, J.D., Nachtigal, M., Barnhart, D., Krech, L., Jani, P., 1987. Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated ribavirin and muramyl tripeptide in experimental infection with influenza or herpes simplex virus. J. Infect. Dis. 155, 510–517.

Gilbert, B.E., Wyde, P.R., 1988. Pharmacokinetics of ribavirin aerosol in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 32, 117–121.

Gilbert, B.E., Wyde, P.R., Wilson, S.Z., Robins, R.K., 1991. Aerosol and intraperitoneal administration of ribavirin and ribavirin triacetate: pharmacokinetics and protection of mice against intracerebral infection with influenza A/WSN virus. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1448–1453.

Grancher, N., Kedzierewicz, F., Venard, V., Marsura, A., Finance, C., Le Faou, A., 2005. Physicochemical study of ribavirin complexes with alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins. J. Incl. Phenom. Macroc. Chem. 51, 149–157.

Grancher, N., Venard, V., Kedzierewicz, F., Ammerlaan, W., Finance, C., Muller, C.P., Le Faou, A., 2004. Improved antiviral activity *in vitro* of ribavirin against measles virus after complexation with cyclodextrins. Antiviral Res. 62, 135–137.

Griffin, D.E., Mullinix, J., Narayan, O., Johnson, R.T., 1974. Age dependence of viral expression: comparative pathogenesis of two rodent-adapted strains of measles virus in mice. Infect. Immun. 9, 690–695.

Honda, Y., Hosoya, M., Ishii, T., Shigeta, S., Suzuki, H., 1994. Effect of ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis virus infections in hamsters. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 653–655.

Hosoya, M., Mori, S., Tomoda, A., Mori, K., Sawaishi, Y., Kimura, H., Shigeta, S., Suzuki, H., 2004. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 4631–4635.

Hovgaard, L., Brondsted, H., 1995. Drug delivery studies in Caco-2 monolayers. IV. Absorption enhancer effects of cyclodextrins. Pharm. Res. 12, 1328–1332.

Huffman, J.H., Sidwell, R.W., Khare, G.P., Witkowski, J.T., Allen, L.B., Robins, R.K., 1973. *In vitro* effect of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. Antimicrob. Agents Chemother. 3, 235–241.

Ishii, T., Hosoya, M., Mori, S., Shigeta, S., Suzuki, H., 1996. Effective ribavirin concentration in hamster brains for antiviral chemotherapy for subacute sclerosing panencephalitis. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 241–243.

Jeulin, H., Grancher, N., Kedzierewicz, F., Le Faou, A.E., Venard, V., 2006. Evaluation by Q-RTPCR of the efficacy of ribavirin complexed with beta-cyclodextrin against measles virus in a mouse encephalitis model. Pathol. Biol. 54, 541–544.

Kende, M., Alving, C.R., Rill, W.L., Swartz Jr., G.M., Canonico, P.G., 1985. Enhanced efficacy of liposome-encapsulated ribavirin against Rift Valley fever virus infection in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 27, 903–907.

Kernahan, J., McQuillin, J., Craft, A.W., 1987. Measles in children who have malignant disease. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.) 295, 15–18.

Lohmann, C., Huwel, S., Galla, H.J., 2002. Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: evaluation of different in vitro assays. J. Drug Target 10, 263–276.

Monnaert, V., Tilloy, S., Bricout, H., Fenart, L., Cecchelli, R., Monflier, E., 2004. Behavior of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood–brain barrier. J. Pharmacol. Exp. Ther. 310, 745–751.

Morrey, J.D., Smee, D.F., Sidwell, R.W., Tseng, C., 2002. Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus. Antiviral Res. 55, 107–116.

Muller, C.P., Kremer, J.R., Best, J.M., Dourado, I., Triki, H., Reef, S., 2007. Reducing global disease burden of measles and rubella: report of the WHO Steering Committee on research related to measles and rubella vaccines and vaccination, 2005. Vaccine 25, 1–9.

Neighbour, P.A., Rager-Zisman, B., Bloom, B.R., 1978. Susceptibility of mice to acute and persistent measles infection. Infect. Immun. 21, 764–770.

Niewiesk, S., Brinckmann, U., Bankamp, B., Sirak, S., Liebert, U.G., ter Meulen, V., 1993. Susceptibility to measles virus-induced encephalitis in mice correlates with impaired antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes. J. Virol. 67, 75–81.

Prokai, L., Prokai-Tatrai, K., Bodor, N., 2000. Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. Med. Res. Rev. 20, 367–416.

Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V., 2002. Measles virus and immunomodulation: molecular bases and perspectives. Expert. Rev. Mol. Med. 2002, 1–18.

Sidwell, R.W., Allen, L.B., Khare, G.P., Huffman, J.H., Witkowski, J.T., Simon, L.N., Robins, R.K., 1973. Effect of 1-beta-D-ribofuranosyl1-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on herpes and vaccinia keratitis and encephalitis in laboratory animals. Antimicrob. Agents Chemother. 3, 242–246.

Uekama, K., Otagiri, M., 1987. Cyclodextrins in drug carrier systems. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 3, 1–40.

Uhlmann, V., Martin, C.M., Sheils, O., Pilkington, L., Silva, I., Killalea, A., Murch, S.B., Walker-Smith, J., Thomson, M., Wakefield, A.J., O'Leary, J.J., 2002. Potential viral pathogenic mechanism for new variant inflammatory bowel disease. J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol. 55, 84–90.

Wyde, P.R., Moore-Poveda, D.K., De Clercq, E., Neyts, J., Matsuda, A., Minakawa, N., Guzman, E., Gilbert, B.E., 2000. Use of cotton rats to evaluate the efficacy of antivirals in treatment of measles virus infections. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1146–1152.

Wyshak, G., Detre, K., 1972. Estimating the number of organisms in quantal assays. Appl. Microbiol. 23, 784–790.

Zhang, M.-Q., Rees, D.C., 1999. A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery. Expert Opin. Ther. Pat. 9, 1697–1717.

VIII.3.2 Complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine

Puisque les résultats obtenus *in vivo* avec l'alpha-cyclodextrine ont confirmé ceux précédemment obtenus *in vitro*, l'amélioration de l'activité antivirale (CI_{50} diminuée de 50%) de la ribavirine au sein du complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine (1:1) obtenue *in vitro* sur les souches Edmonston et CAM/RB du virus de la rougeole [Grancher et al., 2005] devait également être confirmée *in vivo*. Cette étude s'inscrit dans une démarche globale de potentialisation de l'activité de différents antiviraux par la bêta-cyclodextrine ou ses dérivés [Chavanpatil & Vavia, 2004; Nicolazzi et al., 2002; Tilloy et al., 2006].

Le complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine a été testé sur le modèle animal d'encéphalite rougeoleuse mis au point précédemment. Les animaux étaient traités par des doses quotidiennes de ribavirine libre ou complexée à 40 mg/kg de ribavirine. La charge virale a été évaluée dans le cerveau, par RT-PCR quantitative en temps réel, afin de suivre le développement de l'infection. Une augmentation continue de la charge virale dans le cerveau, du jour J3 au jour J6, dans les trois groupes de souris de l'étude (contrôle, ribavirine et ribavirine/bêta-cyclodextrine) permet de confirmer la multiplication virale après l'inoculation intracérébrale. Le développement de l'encéphalite se traduit par l'apparition de signes cliniques (tremblements, prostration) et un ralentissement de la prise de poids des animaux infectés.

Les résultats de la charge virale montrent une diminution non significative au jours J6 de la charge virale dans le cerveau des souris traitées par le complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine de 1,1 Log_{10} Eq copies/ml et de 0,7 Log_{10} Eq copies/ml comparée au traitement par l'eau distillée (contrôle négatif) et par la ribavirine seule, respectivement. De plus, le bénéfice de la complexation à la bêta-cyclodextrine ne s'exprime pas non plus en matière de morbidité.

Là encore, l'injection de ribavirine libre n'apporte aucun bénéfice significatif comparé au traitement par l'eau distillée, comme démontré précédemment sur notre modèle animal [Jeulin et al., 2008] et comme cela avait été démontré chez le hamster avec une dose plus importante de ribavirine (50 mg/kg/jour) [Honda et al., 1994].

Ainsi, le bénéfice du traitement par le complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine n'a pas pu être confirmé *in vivo* sur notre modèle animal d'encéphalite rougeoleuse. Comme l'alpha et la gamma-cyclodextrine, la bêta-cyclodextrine a pourtant la capacité d'interagir avec les membranes biologiques, notamment en extrayant le cholestérol des membranes, comme cela

a été démontré *in vitro* à partir d'un modèle de BHE [Monnaert et al., 2004b]. Mais la bêta-cyclodextrine native ne modifie pas la perméabilité de l'épithélium intestinal chez le rat [Zheng et al., 2006] et des résultats positifs d'augmentation du passage de la BHE n'ont été obtenus *in vitro* que avec des bêta-cyclodextrines modifiées (Rame-bêta-cyclodextrine et Crysme-bêta-cyclodextrine) [Tilloy et al., 2006]. Cette amélioration de la perméabilité s'expliqueraient par une modification de l'activité de P-gp (pompe d'efflux ATP-dépendante présente au niveau de la BHE). Il serait donc intéressant de tester ces molécules *in vivo* dans nos conditions expérimentales.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Pathologie Biologie 54 (2006) 541–544
PATHOLOGIE BIOLOGIE
http://france.elsevier.com/direct/PATBIO/

Evaluation by Q-RTPCR of the efficacy of ribavirin complexed with beta-cyclodextrin against measles virus in a mouse encephalitis model

Évaluation par Q-RTPCR de l'activité antivirale de la ribavirine complexée à la bêta-cyclodextrine native dans un modèle d'encéphalite rougeoleuse expérimentale chez la souris

H. Jeulin[a,*], N. Grancher[a,c], F. Kedzierewicz[b], A.E. Le Faou[a], V. Venard[a]

[a] *GEVSM–SRSMC–UMR 7565 CNRS–UHP, laboratoire de bactériologie–virologie, faculté de médecine, Vandoeuvre-les-Nancy, France*
[b] *GEVSM–SRSMC–UMR 7565 CNRS–UHP, laboratoire de microbiologie moléculaire, faculté de pharmacie, Nancy, France*
[c] *Unité de pharmacie galénique industrielle et officinale, université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique*

Available online 05 October 2006

Abstract

The objective of this work was to study the antiviral activity of ribavirin on measles encephalitis infection when using cyclodextrins as carriers. The use of cyclic oligosaccharides can promote the activity of many drugs and the benefit of the association of ribavirin with β-cyclodextrin has already been demonstrated *in vitro*. Intracranial inoculation of the rodent adapted neurovirulent CAM/RB strain of measles virus induces encephalitis in CBA/ca mice. The antiviral activity of the complex ribavirin/β-cyclodextrin at molar ratio 1:1 has been evaluated *in vivo* in the above encephalitis model. CBA/ca mice were treated with daily intraperitoneal injection of ribavirin (40 mg/kg) with or without β-cyclodextrin. The viral load in the brain of mice was quantified by real-time Reverse transcription-Polymerase chain reaction. Treatment of mice by the complex ribavirin/β-cyclodextrin (1:1) by intraperitoneal route decreases the viral load in the brain of 1.1 and 0.7 $\log_{10}$ Eq copies × mL^{-1} compared to distillated water and ribavirin treatment, respectively. At the same time, free ribavirin injection shows a negligible difference compared to treatment by distillated water.
© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Ce travail étudie l'intérêt de la vectorisation de la ribavirine par les cyclodextrines dans un modèle expérimental d'encéphalite rougeoleuse chez la souris. Le bénéfice de la complexation de la ribavirine à la β-cyclodextrine a précédemment été démontré in vitro. Dans le but de tester cette association in vivo, nous avons mis au point un modèle animal d'encéphalite rougeoleuse chez la souris CBA/ca inoculée par voie intracrânienne avec la souche neurovirulente CAM/RB du virus de la rougeole. Le traitement a consisté en des injections journalières intrapéritonéales de ribavirine à 40 mg/kg ou du complexe ribavirine/β-cyclodextrine (1:1). La charge virale a été évaluée dans le cerveau par transcription inverse–réaction de polymérisation en chaîne, quantitative en temps réel. Les résultats préliminaires montrent une diminution de la charge virale dans le cerveau de 1,1 $\log_{10}$ Eq copies × mL^{-1} et de 0.7 $\log_{10}$ Eq copies × mL^{-1} comparée au traitement par l'eau distillée (contrôle négatif) et par la ribavirine seule, respectivement. Parallèlement l'injection de ribavirine libre ne présente aucun bénéfice comparé au traitement par l'eau distillée.
© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Corresponding author.
E-mail address: helene.jeulin@pharma.uhp-nancy.fr (H. Jeulin).

0369-8114/$ - see front matter © 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.patbio.2006.07.008

Keywords: Measles Virus; Encephalitis; Murin model; Ribavirin; β-cyclodextrin

Mots clés : Virus de la rougeole ; Encéphalite ; Modèle murin ; Ribavirine ; β-cyclodextrine

1. Introduction

Measles virus (MV) a *Morbillivirus* of the *Paramyxoviridae* family is susceptible to ribavirin (RBV) [1] and it is already use in some human case of severe measles infections [2,3]. But measles infection can be complicated by an ear infection, diarrhoea, pneumonia or encephalitis in 10% cases [4] and central nervous system infections remain very difficult to treat because of the action of the blood-brain barrier (BBB) [5]. Only one study displays passage of RBV through the BBB after aerosol administration in mice [6]. Moreover antiviral activity of RBV on subacute sclerosing panencephalitis virus infections in hamsters expressed only after intracranially administration [7]. Intraperitoneal treatment of measles encephalitis by RBV also necessitated development of a new formulation of the drug. Previous results have demonstrated that native cyclodextrins (CDs) are able to complex with many compounds [8] notably antiviral molecules [9]. Therefore we developed the complexation of RBV with CDs in order to increase its bioavailability [10] and showed that RBV/β-CD increases the activity of RBV against MV *in vitro* [11]. At the same time hydroxypropyl β-cyclodextrin appeared to be the more effective enhancer for improving the nasal absorption of acyclovir in the rat compared with four other compounds [12].

In our model, CBA/ca mice were inoculated intracranially with the neurovirulent CAM/RB strain and were treated daily by intraperitoneal injection of either free or β-CD complexed RBV. Effects of treatment on brain viral infection were evaluated by quantitative RT-PCR.

2. Material and methods

2.1. Inoculation to animals

Inbred CBA/ca mice (B&K Universal, East Yorkshire, England) were intracranially inoculated with a rodent brain-adapted CAM/RB strain of MV (kindly provided by Prof Liebert, Leipzig, Germany). We used weaned mice aged from 3 to 4 weeks housing in standardize conditions of temperature (19 °C), light (natural cycle) and humidity (44 to 45%). On day 0 (D0) of the experiment, the same quantity of virus, determined at 1000 PFU (corresponding to 5 times the MV CAM/RB Lethal Dose 50) is injected with a 0.33 × 12.7 mm needle in the right temporal fontanel. Standardized inoculation at 5 mm of depth is realized by using a rubber septa threaded on the needle. Mice have previously been anesthetized by intraperitoneal injection with 50 µL of a solution with 6.25 mg/mL of ketamine (Panpharma, Fougères, France), 6.25 mg/mL of xylazine (Rompun®, Bayer Pharma, Puteaux, France) and 0.25 mg/mL of atropine (Laboratoires Chaix et du Marais, Paris, France).

2.2. Treatments

Both RBV (MP Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) and native β-CD (Wacker-Chemie GmbH, Lyon, France) were dissolved in distilled water and sterilized by filtration through a 0.22 µm membrane (Millipore, Molsheim, France). The RBV/β-CD complexes were prepared at molar ratio 1:1 in distilled water like previously described [10]. Concentrations of RBV/β-CD solutions are expressed as RBV concentrations.

Lethal Dose 50 (LD50) of free or complexed molecules were determined by using groups of 5 to 7 mice intraperitoneally injected with RBV (20 to 480 mg/kg), β-CD (250 to 750 mg/kg) or RBV/β-CD (1:1) (10 to 150 mg/kg of RBV). The highest dose of each drug corresponded to its limit of solubility. LD50 was evaluated after 21 days.

Animals were once daily weighed and treated by intraperitoneal injection of free or complexed molecules. Treatment began one day before inoculation until the end of experiment. Each group contained 29 to 31 mice which corresponds to 3 to 9 mice for each time point and treatment. Animals received at random either distilled water (10 µL/g), either RBV (40 mg/kg) or RBV/β-CD (1:1) (40 mg/kg of RBV). Benefit of the treatment was estimated by determination of the viral load as described below.

2.3. RNA isolation and quantification

From D3 to D6 after inoculation, 3 to 9 mice per group were sacrificed and whole brain was removed and grinded in 2 mL of TRizol® Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Total RNA was extracted according to the instructions of the manufacturer.

MV-nucleoprotein mRNA was detected by quantitative TaqMan Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) in two steps using N primers and probe [13]. The RT was performed for 30 min at 48°C with 10 µL of RNA in a total volume of 25 µL. The reaction mix contained 0.01 M DTT, 0.6 mM dNTPs, 0.8 µM reverse primer, 50 U Multiscribe RT (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), 40 U RNase inhibitor and 1X buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl and 3 mM $MgCl_2$. Specific cDNA was amplified using PCR TaqMan Master Mix 2X (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) including 0.2 µM of forward and reverse primer and 0.1 µM of TaqMan probe. Ten µL of cDNA sample were added to a total volume of 50 µL.

For quantification a serial dilution of measles cDNA standard consisted on a recombinant plasmid including the *N* gene was used (kindly provided by Jacques Kremer, Laboratoire National de Santé, Luxembourg). The PCR reactions have been realized on an ABI Prism 7000 using the following conditions: AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) activation for 10 min at 95°C followed

by 40 cycles of amplification (15 sec at 95°C, 1 min at 60°C). Data were analyzed with ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

3. Results

3.1. Lethal dose 50

The LD50 of free or complexed RBV and β-CD could not be determined because of their limited solubility. Thus no mice died during the 21 days following intraperitoneal injection of RBV (480 mg/kg), β-CD (750 mg/kg) or RBV/β-CD (150/697 mg/kg) (Table 1). Higher doses could not be investigated because of the too important volume of injection it would necessitate.

3.2. Morbidity

During the *in vivo* experiment, comparison of development of mice weights in step with treatment permits to evaluate the toxicity of combined doses. Data were collected each day on remainder mice. In all mice groups we can observe a 20% loss of weight one day after MV inoculation displaying the development of disease (Fig. 1). On the third day post inoculation, animals presented different symptoms like tremors, prostration and suffering signs.

Moreover in the complex-treated group, data shows an acuter loss of weight two days after the beginning of treatment, compared to both control groups (Fig. 1).

Table 1
Lethal Dose 50 (LD50) of free ribavirin (RBV), native β-cyclodextrin (β-CD) and the complex RBV/β-CD at molar ratio 1:1 after intraperitoneal injection to CBA/ca mice

Molecule	LD50 (mg/kg)
RBV	> 480
β-CD	> 750
RBV/β-CD (1:1)	> 150[a]/697[b]

[a] Concentration of RBV.
[b] Concentration of β-CD.

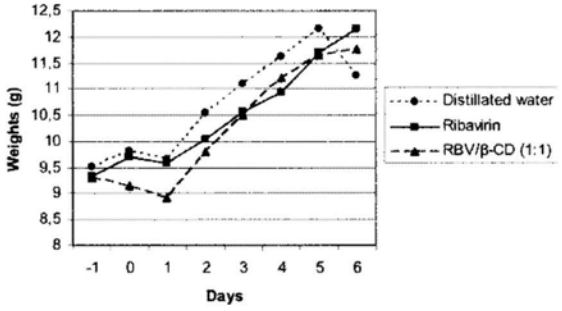


Fig. 1. Evalution of CBA/ca mice weight during intraperitoneal treatment by distillated water, ribavirin or the complex ribavirin/β-cyclodextrin (RBV/β-CD) (1:1) from D-1 to D6 after Measles virus CAM/RB intracranial inoculation.

3.3. Evaluation of the treatments

Treated animals received the same dose of free or complexed RBV (40 mg/kg) or the same volume of distillated water (10 mL/kg). The viral load in the brain was quantified from day 3 (D3) to day 6 (D6) after inoculation. On D3, the mean viral load was 7.8 $\log_{10}$ Eq copies × mL^{-1} (all group of treatment mixed) showing development of the infection in mice brain. Next, the viral load increased from D3 to D6 post-inoculation in all mice groups. The mean virus load in distillated-water treated mice (negative control) increased until 9.5 $\log_{10}$ Eq copies × mL^{-1}. On D6, data display a decrease of viral load for complex treated-mice compared to mocked-mice or ribavirin-treated mice of 1.1 and 0.7 $\log_{10}$ Eq copies × mL^{-1}, respectively (Table 2). Those results were not statistically significant (Mann Whitney test) because of an important standard deviation in the viral load of complex-treated mice probably related to the duality between efficacious treatment and toxicity.

4. Discussion

Our experiment registers itself in a global prospective research for therapeutic activity enhancement by β-CD and their derivatives [9,12,14]. We have previously described that the complexation of RBV by native CD displays *in vitro* an improvement of the antiviral activity of RBV on Measles Virus: β-CD decreases the 50% inhibitory concentration (IC50) of RBV, against Edmonston and CAM/RB MV strains, on Vero cells 2 times [11]. The goal of the study presented here was to set up an animal model to permit *in vivo* testing of such complexation with native β-CD on measles encephalitis. Using inbred CBA/ca mice permitted to limit the difference of sensibility of mice to the neurovirulent strain CAM/RB [15]. Moreover all the experiments were realized using the same working pool of virus consisted of grinding infected brains. Standardized intracranial inoculation blocked at 5 mm by a stopper guarantees a reproducible infection for all animals (checked by i.c. methylene blue injections).

Thus the viral load in the brain increases from D3 to D6 in all group of mice displaying the development of the disease, corroborated by clinical signs of neurological symptoms and weight loss after inoculation. But complex-treated mice seem

Table 2
Comparison of measles virus load in the brain of CBA/ca mice by quantitative RT-PCR. Mice were daily treated intraperitoneally by distillated water (10 ml/kg), ribavirin (40 mg/kg) or the complex ribavirin/β-cyclodextrin (RBV/β-CD) (1:1). (n: number of mice in each group)

Treatment	Mean of Virus titre ($\log_{10}$ Eq copies × ml^{-1}) ± standard deviation (S.D.)			
	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Distillated water	7.66 ± 0.18 (N = 3)	8.12 ± 0.18 (N = 3)	8.69 ± 1.20 (N = 6)	9.46 ± 0.18 (N = 6)
Ribavirin	7.62 ± 0.22 (N = 3)	7.90 ± 0.25 (N = 3)	8.51 ± 0.34 (n = 6)	9.01 ± 0.36 (N = 6)
RBV/β-CD (1:1)	7.96 ± 0.24 (N = 3)	8.16 ± 0.86 (N = 3)	8.58 ± 0.78 (N = 6)	8.35 ± 1.06 (N = 6)

to be more affected by treatment on first days, maybe due to a cumulative toxicity of infection and treatment. Even if LD50 of the complex RBV/CD (1:1) was not estimated because of the low solubility of both drugs, employed therapeutic doses are much under the maximal dose tested. However concentration preventing BBB integrity has been described *in vitro* to be 1mM for β-CD [16] and the injected treatment solution is at a β-CD concentration of 16.4 mM by intraperitoneal route. One can estimate that the local concentration of β-CD in the brain could probably be higher than 1mM leading to a none lethal but real toxic effect noticed by the decrease of weight after beginning of treatment on RBV/β-CD complex-treated mice.

For viral load evaluation, TaqMan RT-PCR provides the assay with a far better specificity and high sensitivity (lower limit 10^3 Eq copies x mL^{-1}). In those conditions decrease of more than 1 log_{10} Eq copies/mL^{-1} in RBV/β-CD group is clinically significant [17]. RBV decreases the viral load of 0.4 log_{10} Eq copies x mL^{-1} compared to negative control. This later result agrees with Honda's study which concludes that ribavirin did not improve the survival of measles infected hamsters when administrated intraperitoneally at the dose of 50 mg/kg/day [7].

Enhancement of RBV activity by β-CD is probably related to its action on biological membranes. BBB acts as an anatomical and transporter barrier notably due to the presence of tight junctions and the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein (P-gp), respectively. Indeed β-CD is able to disrupt the cell membrane by complexation with phospholipids enhancing gene transfer efficiencies [18]. It has also been described that native β-CD extract cholesterol from an *in vitro* model of BBB [16]. Interaction between the CDs and the BBB components could lead to a fragility of the BBB by acting on passive transport or could take effect on the ATP-dependant efflux pump P-gp activity [14]. Effect of native β-CD on the P-gp activity was not explored but methyled β-CDs are implicated in the deliverance of P-gp substrates by modifying the P-gp activity. In return β-CD exerts no apparent effect on the permeation across rat intestinal epithelium [19].

The encephalitis CBA/ca mice model is the first study of evaluation of the vectorisation of RBV by native β-CD *in vivo*. Regarding to recent results obtained *in vitro* with methylated β-cyclodextrin it would be interesting to test different other carriers like crysme-β-CD for example which revealed itself to be a more effective transporter of doxorubicin across a membrane composed of brain capillary endothelial cells [14].

References

[1] Huffman JH, Sidwell RW, Khare GP, Witkowski JT, Allen LB, Robins RK. In vitro effect of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. Antimicrob Agents Chemother 1973;3(2):235–41.

[2] Forni AL, Schluger NW, Roberts RB. Severe measles pneumonitis in adults: evaluation of clinical characteristics and therapy with intravenous ribavirin. Clin Infect Dis 1994;19(3):454–62.

[3] Hosoya M, Mori S, Tomoda A, Mori K, Sawaishi Y, Kimura H. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(12):4631–5.

[4] Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Measles virus and immunomodulation: molecular bases and perspectives. Expert Rev Mol Med 2002:1–18.

[5] Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. Mol Interv 2003;3(2):90–105 (51).

[6] Gilbert BE, Wyde PR. Pharmacokinetics of ribavirin aerosol in mice. Antimicrob Agents Chemother 1988;32(1):117–21.

[7] Honda Y, Hosoya M, Ishii T, Shigeta S, Suzuki H. Effect of ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis virus infections in hamsters. Antimicrob Agents Chemother 1994;38(4):653–5.

[8] Zhang M-Q, Rees DC. A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery. Expert Opinion on Therapeutic Patents 1999;9:1697–717.

[9] Nicolazzi C, Venard V, Le Faou A, Finance C. In vitro antiviral efficacy of the ganciclovir complexed with beta-cyclodextrin on human cytomegalovirus clinical strains. Antiviral Res 2002;54(2):121–7.

[10] Grancher N, Kedzierewicz F, Venard V, Marsura A, Finance C, Le Faou A. Physicochemical Study of Ribavirin Complexes with alpha-, bêta- and gamma-Cyclodextrins. J Incl Phenom Macroc Chem 2005;51:149–57.

[11] Grancher N, Venard V, Kedzierewicz F, Ammerlaan W, Finance C, Muller CP. Improved antiviral activity in vitro of ribavirin against measles virus after complexation with cyclodextrins. Antiviral Res 2004;62(3):135–7.

[12] Chavanpatil MD, Vavia PR. The influence of absorption enhancers on nasal absorption of acyclovir. Eur J Pharm Biopharm 2004;57(3):483–7.

[13] Uhlmann V, Martin CM, Sheils O, Pilkington L, Silva I, Killalea A. Potential viral pathogenic mechanism for new variant inflammatory bowel disease. Mol Pathol 2002;55(2):84–90.

[14] Tilloy S, Monnaert V, Fenart L, Bricout H, Cecchelli R, Monflier E. Methylated beta-cyclodextrin as P-gp modulators for deliverance of doxorubicin across an in vitro model of blood-brain barrier. Bioorg Med Chem Lett 2006;16(8):2154–7.

[15] Neighbour PA, Rager-Zisman B, Bloom BR. Susceptibility of mice to acute and persistent measles infection. Infect Immun 1978;21(3):764–70.

[16] Monnaert V, Tilloy S, Bricout H, Fenart L, Cecchelli R, Monflier E. Behavior of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier. J Pharmacol Exp Ther 2004;310(2):745–51.

[17] Elbeik T, Charlebois E, Nassos P, Kahn J, Hecht FM, Yajko D. Quantitative and cost comparison of ultrasensitive human immunodeficiency virus type 1 RNA viral load assays: Bayer bDNA quantiplex versions 3.0 and 2.0 and Roche PCR Amplicor monitor version 1.5. J Clin Microbiol 2000;38(3):1113–20.

[18] Tang GP, Guo HY, Alexis F, Wang X, Zeng S, Lim TM. Low molecular weight polyethylenimines linked by beta-cyclodextrin for gene transfer into the nervous system. J Genet Med 2006;8(6):736–44.

[19] Zheng Y, Zuo Z, Chow AH. Lack of effect of beta-cyclodextrin and its water-soluble derivatives on in vitro drug transport across rat intestinal epithelium. Int J Pharm 2006;309(1-2):123–8.

IX. ETUDE PHARMACOCINETIQUE DU COMPLEXE RIBAVIRINE/ALPHA-CYCLODEXTRINE

IX.1 DEMARCHE EXPERIMENTALE

En raison de la complexité de la matrice constituant le tissu cérébral, l'étape limitante de l'étude était l'extraction de la ribavirine à partir du cerveau des souris traitées.

Différents protocoles ont été précédemment décrits utilisant des colonnes de chromatographie contenant du phénylboronate, l'injection étant précédée ou non d'une étape de déprotéinéisation par centrifugation au travers de filtres spécifiques CF25 cones (Amicon Corp.) [Gilbert et al., 1985; Homma et al., 1999]. Pour éviter l'utilisation de ces systèmes coûteux, différents protocoles ont été testés pour débarrasser l'échantillon des composés indésirables et risquant d'interférer avec la détection spectrophotométrique de la ribavirine.

Dans un premier temps, les échantillons de cerveau ont été broyés mécaniquement dans 1 ml d'eau distillée et centrifugés pour éliminer la plupart des débris cellulaires. Seulement, la précipitation des lipides par le dichlorométhane (1 ml/échantillon) suivie d'une étape de décantation ne permettait pas d'isoler le pic de ribavirine en CLHP. D'autres essais ont étudié le pré-traitement de l'échantillon par la chaleur (90°C) ou par l'éthanol à -20°C ou l'acide perchlorique [2,3M] sans permettre l'élimination des protéines interférentes.

Finalement, la technique choisie a reposé sur une étape d'extraction en phase solide, précédée de la centrifugation du broyat de l'échantillon et suivie d'une étape de lyophilisation. L'extraction en phase solide est utilisée couramment pour purifier ou concentrer un extrait brut préalablement au dosage d'un ou de plusieurs de ses composants. A cette fin, est utilisée une petite cartouche ouverte en matière plastique, ressemblant à un corps de seringue, contenant un adsorbant solide approprié, ici 100 mg d'acide phényl boronique, sur lequel passe un volume connu de l'extrait brut.

Il existe deux modes d'utilisation des cartouches d'extraction en phase solide : le mode le plus courant consiste dans un premier temps à retenir sur l'adsorbant les composés d'intérêt pour l'analyse projetée et à éliminer de la matrice initiale, par rinçage, le plus grand nombre possible de constituants jugés indésirables pour la suite du dosage. Et, dans un second temps de récupérer par élution les analytes avec un faible volume de solvant. La

solution obtenue est ainsi fortement enrichie en analytes. L'autre mode, moins fréquent, consiste à faire passer l'échantillon sur l'adsorbant pour retenir les composés non désirés tandis que les analytes passent librement. Dans ce cas les composés à analyser sont purifiés mais non concentrés. Le premier mode d'utilisation a été retenu pour ce travail car il était nécessaire de concentrer l'extrait en ribavirine.

Dans cette étude nous avons utilisé une cartouche d'acide phényl boronique qui va se lier spécifiquement aux groupements hydroxyles vicinaux coplanaires de la ribavirine. Lors du conditionnement de la cartouche en milieu basique, l'acide phényl boronique se transforme en phénylboronate (Figure 20a), permettant la formation d'une liaison covalente avec les diols vicinaux de la ribavirine. La libération du diol est réalisée en milieu acide (Figure 20b).

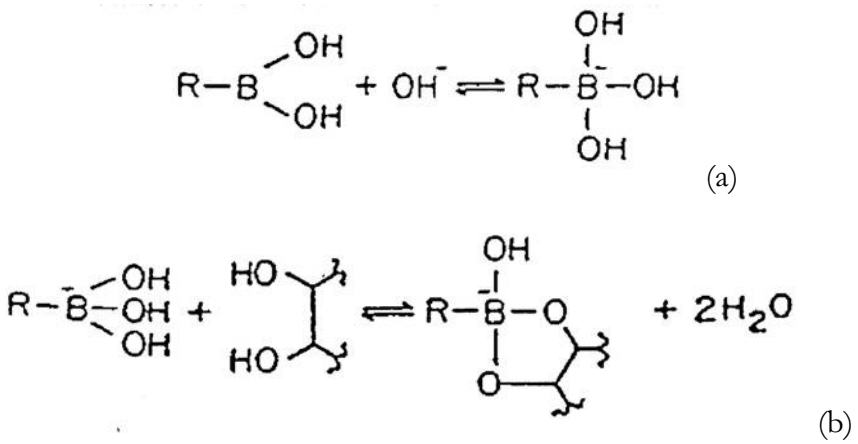


Figure 20. Interaction entre l'acide phényle boronique et un groupement diol [Mazzeo & Krull, 1989]

Après l'étape d'extraction en phase solide, il était nécessaire d'éliminer l'acide formique utilisé pour l'étape d'élution. Une méthode de séchage par la chaleur sous dépression (SpeedVac) a été expérimentée, mais conduisait à une dégradation de la ribavirine. C'est donc la lyophilisation qui a été utilisée car elle a permis de sécher l'éluât tout en préservant la ribavirine.

La quantification a ensuite été réalisée par une technique de CLHP couplée à une détection par spectrophotométrie UV.

IX.2 RESUME DE L'ARTICLE

Afin de déterminer l'impact de la complexation ribavirine/alpha-cyclodextrine sur la pharmacocinétique de la ribavirine dans le cerveau, un protocole d'extraction a été mis au point, combinant des techniques d'extraction en phase solide de la ribavirine et de lyophilisation de l'extrait obtenu. La quantification par CLHP de molécules dans les tissus est délicate notamment dans des échantillons de tissu cérébral qui sont riches en composés insolubles comme les lipides ou solubles comme les protéines. Plusieurs traitements successifs sont nécessaires pour broyer, homogénéiser et clarifier l'échantillon.

La quantification de la ribavirine a été réalisée par CLHP en phase inverse avec détection par spectrophotométrie UV, après élaboration *ex vivo* d'une gamme de calibration. Les résultats ont été standardisés grâce à l'ajout d'un standard interne avant l'étape d'extraction. La quantité de ribavirine présente dans le cerveau a été évaluée de 30 minutes à 48 heures après injection par voie intrapéritonéale de doses uniques (40, 100 ou 200 mg/kg) ou répétées (40 mg/kg/jour pendant 6 jours) de ribavirine libre ou complexée, chez la souris saine ou après inoculation intracrânienne d'une souche neurovirulente du virus de la rougeole. Seule l'alpha-cyclodextrine a été utilisée pour la complexation à la ribavirine car elle permettait une amélioration de l'activité antivirale *in vivo*.

Chez la souris saine, la concentration maximale de ribavirine, s'élève à 5, 9, et 25 nmol/cerveau, 3 à 6 heures après l'injection d'une dose unique de 40, 100 ou 200 mg/kg respectivement de ribavirine libre. Après administration de 40 ou 100 mg/kg de ribavirine complexée, la concentration maximale atteint 11 et 14 nmol/cerveau respectivement, 2 à 3 h après l'injection. La quantité de ribavirine retrouvée dans le cerveau est donc significativement plus élevée lorsque la molécule est injectée sous forme de complexe ($p< 0,0001$ et $p=0,002$ à 40 et 100 mg/kg respectivement) et la concentration maximale est obtenue plus rapidement lors de l'utilisation de ribavirine complexée à 100 mg/kg. Les quantités de ribavirine trouvées sont de l'ordre de la nanomole, ce qui est en bonne corrélation avec les données de la littérature [Gilbert et al., 1991]. En revanche, le temps maximal (Tmax) observé après injection de ribavirine libre diffère de celui obtenu après des injections intramusculaires chez le rat [Ferrara et al., 1981] ou intrapéritonéales chez la souris [Gilbert et al., 1991].

Par ailleurs, chez la souris infectée, les cinétiques réalisées au troisième jour après l'inoculation virale montrent que l'infection augmente significativement la quantité de

ribavirine présente dans le cerveau ($p< 0,0001$) après administration de ribavirine libre. Les modifications de la structure de la BHE observées au cours des états pathologiques inflammatoires, telles que l'ouverture des jonctions serrées permettent d'expliquer ces résultats [Avison et al., 2004; Persidsky et al., 2006]. Lorsque la souris infectée est traitée quotidiennement à 40 mg/kg/jour, la quantité de ribavirine retrouvée dans le cerveau au jour J6 est plus élevée au cours du traitement par le complexe, à dose équivalente de ribavirine ($p=0,02$).

En conclusion, l'administration du complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine augmente significativement la quantité de ribavirine présente dans le cerveau, chez la souris saine ou infectée, ce qui permet d'expliquer l'amélioration de l'activité antivirale observée au cours du traitement par le complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine sur notre modèle animal d'encéphalite rougeoleuse.

Il est actuellement reconnu que les cyclodextrines ne pénètrent pas la BHE [Loftsson et al., 2007] donc agissent en amont de celle-ci. Il apparaîtrait également que la formation d'un complexe n'est pas nécessaire pour favoriser la diffusion des molécules à travers les membranes biologiques et que l'administration concomitante du vecteur et de l'agent thérapeutique serait suffisante pour améliorer la diffusion au niveau du cerveau [Tilloy et al., 2006]. Dans ces conditions, la formation et l'administration d'un complexe présentant une constante de stabilité élevée pourraient être défavorables à l'activité thérapeutique de la molécule hôte, comme nous l'avons observé avec le complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine [Jeulin et al., 2006]. Ces hypothèses nécessitent d'être confirmées par des expériences ultérieures, *in vivo*.

Effective ribavirin concentration in mice brain using cyclodextrin as a drug carrier: Evaluation in a measles encephalitis model

Jeulin H[* a,b], Venard V[a], Carapito D[b], Finance C[b], Kedzierewicz F[b]

Summary

Ribavirin is a water-soluble synthetic nucleoside with broad spectrum antiviral properties, but it is ineffective against major viral encephalitis because of a failure to cross the blood brain barrier. The antiviral activity of the complex ribavirin/alpha-cyclodextrin was previously demonstrated to be stronger than free ribavirin, on an in vivo model of measles virus encephalitis in mice. The probable role of cyclodextrin on ribavirin quantity enhancement into the brain needs to be defined. Ribavirin specific extraction from brain tissue was developed, based on a solid phase extraction. It was quantified by high performance liquid chromatography at different time points after intraperitoneal injection of single or multiple doses of free ribavirin or of the complex ribavirin/alpha-cyclodextrin. Whatever the tested dose (40 or 100 mg/kg), quantity of ribavirin in the brain is significantly higher ($p<0.001$) when the drug is injected as a complex with alpha-cyclodextrin, in healthy or measles virus-infected mice. So pharmacokinetics of ribavirin in brain tissue explains the advantage of the complex ribavirin/alpha-cyclodextrin over ribavirin in protecting mice from intracerebral infection with measles virus and confirms the interest of cyclodextrin complexes for human central nervous system diseases treatment.

Keywords: Ribavirin, Alpha-cyclodextrin, Blood Brain Barrier, Measles virus, Encephalitis

1. Introduction

Ribavirin [1-(β-D-ribofuranosyl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide] is a water-soluble synthetic nucleoside with broad spectrum antiviral properties (Huffman et al., 1973). It has been shown to be ineffective against many encephalitis viruses in mice after intraperitoneal (i.p.), subcutaneous or intramuscular injection (Bussereau et al., 1988; Sidwell et al., 1973). In contrast, ribavirin (RBV) improved the survival of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus infected hamsters but only when administered intracranially and did not improve their survival when administered intraperitoneally (Honda et al., 1994), suggesting a failure of RBV to access to the brain.

The central nervous system is protected by the blood brain barrier (BBB), a particular tissue structure. The BBB controls the passage from the blood to the cerebral nervous system of neurological toxins as well as therapeutic molecules. Thus, a major challenge of treatments of brain disorders is to overcome this barrier.

Cyclodextrins (CDs) can form either inclusion complexes where a lipophilic guest molecule, for example a drug molecule, is located within the lipophilic central cavity or non-inclusion complexes where the hydroxyl groups on the outer surface of CD molecules can form hydrogen bonds with other molecules (Loftsson and Duchene, 2007), including RBV (Grancher et al., 2005). CDs were proposed as a solution to improve RBV bioavailability in the brain after i.p. administration. In pharmaceutical applications, CDs are generally used as solubilizers (Loftsson and Brewster, 1996). Since RBV is highly soluble in water, the interest of the use of cyclodextrin in a complex form with RBV is rather their capacity to improve bioavailability (Uekama and Otagiri, 1987). Moreover, studies on CDs behavior on biological membranes demonstrated enhancement of drug absorption across dermal, nasal, intestinal or blood-brain barrier by extracting cholesterol, phospholipids or proteins from membranes

(Monnaert et al., 2004b). These properties of CD suggest that RBV/CD complexes have an interest in targeting RBV into the brain.

RBV-sensitive viruses responsible for encephalitis include measles, haemorragic fever, West Nile, tick born encephalitis and Japonese encephalitis. We chose measles virus (MV) since antiviral activity of RBV against MV had already been assessed in hispid cotton rats, infected by either aerosol or i.p. route (Wyde et al., 2000) and in hamsters after intracranial injection (Honda et al., 1994).

We previously developed a MV encephalitis model in mice, based on CAM/RB neurovirulent MV strain and measles-susceptible CBA/ca mice injected intracranially (Jeulin et al., 2006). Thus, previous studies on this MV encephalitis model in mice have demonstrated that i.p. injection of RBV/α-CD (1:3) complex (40 mg/kg of RBV) increased antiviral activity compared to free RBV injection at the same dose: the MV-viral load was reduced in mice brain and the morbidity (weight loss) and mortality rate decreased in the complex-treated group, from 80% to 40% for mortality rate for RBV and RBV/ α-CD treated mice respectively (Jeulin et al., 2008). The aim of this work was to explain increased antiviral activity in the presence of CD: is there with an increased quantity of RBV into the brain? To confirm influence of CD on drug concentration into the brain, a protocol of RBV extraction from the brain was developed; it was based on organ sample grinding, solid-phase extraction and extract freeze-drying. Quantification was realized by high performance liquid chromatography (HPLC) with spectrophotometer detection, using calibration curve prepared ex vivo, at different time points after single or multiple i.p. injections of the free RBV or the complex RBV/α -CD.

2. Materials and method

2.1 Chemicals and reagents

All chemicals were of HPLC or reagent grade. Acetonitrile and formic acid were obtained from Carlo Erba reagenti (Val de Reuil, France), and Ammonium acetate and ammonia solution from Merck (Lyon, France). Ammonium phosphate and 3-methylcytidine methosulfate (as an internal standard) were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France) and RBV from MP Biomedical (Illkirch, France). All chemicals where diluted with HPLC-grade water.

Phenyl boronic acid (PBA) cartridges (Bond Elute PBA [100 mg]) used for solid-phase extraction were obtained from Varian (Les Ulis, France).

The RBV/α-CD complex was prepared at a molar ratio of 1:3 in distilled water as previously described (Grancher et al., 2004). Concentrations of RBV/α-CD solutions are expressed as RBV concentrations. Both RBV and RBV/α-CD complex were dissolved in distilled water and sterilized by filtration through a 0.22 µm membrane.

2.2 High Performance Liquid Chromatography

2.2.1 Apparatus and conditions

The HPLC system used in this study consisted of a vacuum degasser SCM1000 (Thermo-Finnigan, San Jose, USA) and a barrow-bore quarterly Spectra System P1000XR (Thermo-Finnigan, San Jose, USA) gradient pump with a loop of 20 µl. A C_{18} reversed phase column TSKgel ODS-120T (250 length × 4.6 mm i.d.) from Tosoh Bioscience (Lyon, france) was used and thermostated at 25°C with a column temperature controller 560-CIL (Cluzeau Info Labo, Puteaux-la-Défense, France). The effluents were monitored with a double-beam spectrophotometric detector (Spectrasystem UV1000, Thermo-Finnigan, San Jose, USA) at 207 nm.

The mobile phase consisted on an aqueous ammonium phosphate buffer solution (0.087 M, pH 6.5). The flow rate of eluant was set at 1 ml/min.

2.2.2 Sample preparation for HPLC

Brain tissues were suspended in 1 ml of distilled water and grinded. A volume of 0.025 ml of a 100 mg/l solution of 3-methylcytidine methosulfate in distilled water was added to each sample as an internal standard. The homogenate was processed by centrifugation at 20.000 × g, for 30 minutes at +4°C to remove debris. Sample supernatant was neutralized with 3 ml of aqueous ammonium acetate buffer (250 mM, pH = 8.5).

The Bond Elute PBA cartridge was pre-treated with 1 ml of 100 mM formic acid followed by 5 ml of 250 mM ammonium acetate buffer (pH = 8.5). The neutralized sample was loaded onto the treated-Bond Elute PBA cartridge and allowed to percolate.

RBV and the internal standard were collected by eluting the cartridge two times with 1 ml of 100 mM formic acid and then freeze-dried. Twenty-microliter of each sample, reconstituted in 1 ml of mobile phase, were injected onto the HPLC column.

2.3 In vivo quantification of ribavirin in the brain

2.3.1 Animals

CBA/ca mice of either sex (weight range 10 g to 15 g at experimental onset) from Harlan France SARL (Gannat, France) were maintained in plastic cages under natural light cycle at 19°C and 44 to 45% humidity. Food and water were provided ad libitum. All local legal and ethical requirements were observed. MV infected and control animals were housed in separate rooms.

2.3.2 Intracerebral MV challenge

On day 0, CBA/ca mice (3 to 4 weeks-old) were anesthetized by intraperitoneal administration of 50 µl of a solution containing 6.25 mg/ml ketamine, 6.25 mg/ml xylazine and 0.2 mg/ml atropine (corresponding almost to 26 mg/kg of ketamine and xylazine and 0.8 mg/kg of atropine). The mice were next intracerebrally injected with 1×10^3 PFU of the rodent brain-adapted CAM/RB strain of MV (kindly provided by Prof Liebert, Leipzig, Germany), as previously described by Jeulin et al. (2008). The same working stock of virus (titer of 7.40 $\log_{10}$ Eq. PFU/ml) was used for all in vivo experiments (Wyshak and Detre, 1972).

2.3.3 Intraperitoneal treatment

At least, three mice were used for each time point.

Single dose

Healthy CBA/ca mice were weighed and treated by i.p. injection of a single dose of free RBV (40, 100 or 200 mg/kg) or of the complex RBV/α-CD (corresponding to 40 or 100 mg/kg of RBV). Concentration of RBV in the brain was quantified from 30 minutes to 48 hours after i.p. injection.

In MV infected mice, i.p. injection of a single dose of 40 mg/kg of free RBV or of the complex RBV/α-CD was performed on day 3 after intracerebral injection of MV, when viral load reached 2.10^7 equivalent copies/brain (quantification by polymerase chain reaction of the N gene of MV), according to Jeulin et al. (2008).

Multiple doses

Mice were weighed and treated once a day by i.p. injection of RBV (40 mg/kg) or RBV/α-CD (1:3) complex (corresponding to 40 mg/kg of RBV) from the day before challenge until the day 4. RBV was extracted from the brain 3 and 5 hours after the last i.p. injection, depending on the T_{max} observed in single dose studies.

2.3.4 Ribavirin quantification

A stock solution of RBV was prepared at a concentration of 40 mM in HPLC-grade water and stored at 4°C for 1 week. For ex vivo calibration curve preparation, reference samples containing 2, 4, 8, 12, 18, 24 and 30 nmol of RBV were prepared by diluting stock solution with drug-free grinded brain tissue. The calibration curve was determined by plotting the peak area ratio of RBV to the internal standard against the RBV quantity added in the brain sample.

2.4 Statistical analyses

Two-tailed statistical analyses were performed using Statview software for windows (version 5; Abacus Concepts). Univariate analyses of variables were performed by unpaired t-test. $P<0.05$ was considered to be significant in all analyses.

3. Results

3.1 Quantification of ribavirin in brain tissue

The proposed method to extract RBV from brain was an adaptation of the blood sample preparation procedure, previously described by Homma et al. (Homma et al., 1999) (Homma et al., 1999). The RBV extraction was preceded by brain grinding and a centrifugation step. The solid phase extraction was followed by a freeze-drying step before dissolution in mobile phase. RBV extraction was based on use of phenyl boronic acid bond elut cartridge which specifically retains oligosaccharides alditols via interactions of sterically unbindered vicinal hydroxyl group, present in RBV structure (Stoll and Hounsell, 1988). Indeed, the matrix bound phenyl boronic acid was activated in basic medium to give phenylboronate and permitted covalent bonding of planar vicinal diol to phenylboronate. Diols were released from the complex by diluted acid.

A typical chromatogram of RBV treated-mice brain sample is shown in Figure 1. Sample pre-treatment and solid-phase extraction permitted RBV and internal standard peaks isolation on the chromatogram. The retention time of RBV and internal standard were 5.9 and 10.7 min, respectively. At those times, no interfering peaks were observed on the chromatogram for untreated mice brain (data not shown).

A linear calibration curve was obtained ex vivo from 2 to 30 nmol/brain. The equation for the line, calculated by regression analysis, was $y = 0.0111x - 0.0262$ ($r^2 = 0.9927$) where y is the mean peak area ratio of RBV/internal standard and x the quantity of RBV per brain. The RBV concentration of each sample was estimated from this standard curve.

3.2 Ribavirin pharmacokinetics following ribavirin or ribavirin/α-cyclodextrin intraperitoneal administration

3.2.1 Single dose in healthy mice

In the first trial, RBV pharmacokinetic parameters in brain were determined in healthy mice, using the method described above. Intraperitoneal injection of healthy mice with a single dose of free RBV at 40, 100 or 200 mg/kg resulted in a maximal concentration (C_{max}) of 5.23±0.56, 9.39±0.64 or 25.31±0.86 nmol/brain respectively, at a maximal time (T_{max}) of 3 to 6 hours after injection. RBV is present in the brain up to 24 hours (Figure 2).

After i.p injection of a single dose of RBV/α-CD complex at 40 or 100 mg/kg, the quantity of RBV in the brain was maximal 2 to 3 hours respectively after inoculation and then decreased up to 24 hours. The Cmax reaches 11.49±1.28 and 14.39±0.35 nmol/brain, respectively.

Regardless of the dose used, the quantity of RBV in the brain was 1.5 to 2 times above, thus significantly higher ($p<0.0001$ and $p=0.002$ respectively) when the drug was administered as a complex of RBV/α-CD (Figure 2). After RBV/α-CD-treatment (100 mg/kg), the maximal quantity was obtained earlier (2 hours) than after free RBV-treatment (6 hours).

3.2.2 Single dose in measles virus-infected mice

When RBV was administered as a single dose of free ribavirin at 40 mg/kg, on day 4 after intracranial injection of MV, RBV quantity in the brain reached the highest concentration 3 hours after drug injection (Figure 3a). The mean brain concentration for RBV from 30 minutes to 24 hours after drug injection was significantly higher in mice developing measles encephalitis than in healthy mice ($p<0.0001$).

On the other hand, in RBV/α-CD-treated mice, MV encephalitis infection does not impact on RBV quantity in the brain (Cmax = 11.5±0.31 nmol/brain). RBV maximal quantity occurred 5 hours after drug administration instead of 3 hours in healthy mice (Figure 3b).

So, measles infection impacts on RBV quantity in brain only if it is injected in the free form.

3.2.3 Multiple doses in measles virus-infected mice

RBV level in brain tissue was determined after mice were treated with either RBV or RBV/α-CD complex (40 mg/kg/day of RBV) for 6 days. The treatment began one day before MV intracranial injection. Since RBV quantity is maximal 3 hours and 5 hours after administration of free RBV or the complex, respectively, the both periods were selected for determination of drug concentration in the brain after multiple doses in infected mice. Three hours after the last i.p. injection, mean RBV concentration was determined to be 12.74±0.29 nmol/brain in free RBV-treated mice and 14.73±1.85 nmol/brain in complex-treated mice (Figure 4). At t=5 hours, mean RBV quantity in the brain was 9.47±1.68 and 9.61±1.18 nmol/brain for RBV and complex-treated mice, respectively. The differences were not significant.

4. Discussion

In the present study, we have adapted an HPLC method for RBV quantification to ex vivo mice brain samples. This method was first validated on RBV stock solution dilutions.

HPLC determination of drugs in solid tissues is problematic and requires multiple steps extraction procedure. Especially brain tissue is rich of both insoluble materials such as lipids and soluble tissue compounds such as proteins. Samples thus need to be homogenized and clarified from tissue debris and compounds before RBV separation.

RBV was thus quantified in the whole brain. This raises the question of sample contamination by circulating blood which might interfere on RBV quantification into the brain tissue. The rate of RBV contained in biological fluids into the brain and the influence

upon RBV quantification was estimated to have minor impact, due to the small amount of liquid volume within the brain (0.0252 ml) (Gilbert and Wyde, 1988). In fact, when comparing RBV and RBV/α-CD-treated mice, RBV quantity in the brain due to biological fluids contamination may remain the same in both cases.

In healthy mice, after a single dose of free drug, the maximal concentration of RBV in the brain was observed 3 hours after i.p. injection of free ribavirin, whereas it was observed later (at 8 hours) after intra-muscular injection in rats (Ferrara et al., 1981), or earlier (at 30 minutes) after RBV i.p. injection (25 mg/kg) in mice(Gilbert et al., 1991). Differences observed were probably due to the site of injection and to the used dose. Determined concentrations of RBV in the brain were in nanomolar range, which is in good correlation with previous findings (Gilbert et al., 1991). Moreover, the RBV quantity in the brain (5, 9 or 25 nmol/brain) was correlated to the injected dose (40, 100 or 200 mg/kg), proving that, up to the maximal tested dose, RBV system of transport is not saturated.

After i.p. injection of the complex RBV/α-CD in healthy mice, the RBV quantity in the brain is up to 2 times higher than RBV quantity in the brain after free drug injection at the same dose and in the same conditions. Previously described improved in vivo antiviral activity (Jeulin et al., 2008) is related to increased RBV quantity in neuronal tissue and suggests that the CD act as ribavirin permeation enhancer through the BBB. Various effects of CDs on drug delivery through biological membranes have been already proven on intestinal, nasal, buccal and lung mucosa, skin, cell cultures (caco-2 cells) or other artificial membranes (Loftsson et al., 2007). Moreover permeation enhancement through the BBB has been demonstrated in vitro by Monnaert et al. (2004a). Our results confirm in vivo permeation enhancement through the BBB previously demonstrated in vitro.

The consequences of an infection on the BBB needed to be evaluated. In MV-challenge mice (day 4 post-inoculation, viral load of 8.10 $\log_{10}$ Eq. copies/ml) the mean RBV

quantity in the brain (8.4 nmol/brain) after a single dose of free drug (40 mg/kg) is significantly higher ($p<0.0001$) than in healthy mice (Cmax = 5.2 nmol/brain). It is known that in central nervous system diseases states, changes of tight junctions occur in the brain and that neuroinflammatory conditions (including encephalitis) are characterized by BBB disruption and tight junction opening via cytokines and chemokines secreted by macrophages and microglia (Avison et al., 2004; Persidsky et al., 2006). The changes in BBB structure and function under pathologic conditions can explain the improved RBV quantity in the brain, after free drug injection, due to the diffusion of the unbound drug through released tight junction. Moreover, it could not be ignored that lesions in the brains of intracerebral injected mice might affect RBV pharmacokinetics but it would not distort comparison between treatments within infected mice.

Nevertheless, in the complex-treated group of mice (40 mg/kg of RBV) the maximal RBV quantity in the brain of measles virus challenged mice (day 4 post-challenge) was delayed but remained equal (around 11 nmol/brain) to the one in healthy mice. But RBV quantity was still higher from 6 to 24 hours post-injection. So, measles encephalitis influenced in a different way RBV passage through the BBB after free RBV or complex treatment. Because of their chemical structure (large number of hydrogen bond donors and acceptors, high molecular weight and low octanol/water partition coefficient), CDs do not penetrate biological membranes (Loftsson et al., 2007). Even if RBV quantity in the brain increases after free drug injection during measles infectious state, the benefit of the complex still occurs in measles virus encephalitis mice. Thus, despite BBB disruption during diseases states, cyclodextrins may act in another way to increase RBV bioavailability into the brain.

Thus, on our in vivo model, RBV quantity in the brain increased when it was intraperitoneally administered as a complex with α-CD, probably following an increased transport through the blood-brain barrier. In one hand, despite CDs properties to extract

membrane compounds and to disrupt BBB cohesion, Monnaert et al. have demonstrated that γ-CD and derivatives were not able to increase the delivery of doxorubicin across an in vitro model of BBB, probably due to the low complex penetration through the model of BBB (Monnaert et al., 2004a). On the other hand, co-incubation of various β-CDs and doxorubicin on the same in vitro model of BBB improves doxorubicin delivery into the brain (Tilloy et al., 2006).

In comparison to these studies on the complex doxorubicin/γ-CD, our positive results could be explained by the greater interaction existing between α-CD with brain capillary endothelial cells compared to γ-CD and a greater ability to extract membrane compounds such as phospholipids, cholesterol and proteins (Monnaert et al., 2004b). Secondly, our model of RBV targeting to the brain was probably closer to the co-incubation of doxorubicin and β-CD of Tilloy et al. (2006), since RBV/CDs complexes have been proven to be rather external molecular associations than true host guest inclusions (Grancher et al., 2005), with apparent better availability of the guest molecule. Likewise, when the treatment solutions are administered parenterally, drugs are rapidly and quantitatively released from CD solutions (Uekama and Otagiri, 1987), so the benefits of the complexation of RBV with α-CD may include nucleoside analogue protection within the organism and blood-brain barrier permeation enhancement. Given that, in aqueous solution, the equilibrium between guest and host molecule and the degree of the dissociation are dependant on the magnitude of the stability constant of the complex, the lack of antiviral activity improvement of the complex RBV/β-CD (Jeulin et al., 2006) may be due to the RBV/β-CD complex higher stability constant compared to RBV/α-CD complex (2606 vs. 1493 M^{-1} for RBV/β- and α-CD respectively) (Grancher et al., 2005).

After multiple doses, the RBV quantity in the brain 3 hours after the last injection is higher than 3 hours after a single dose, in agreement with the long half-life of the drug. But, in

those conditions, previously demonstrated benefit of the complex on antiviral activity is not enlightened by improved RBV quantity in the brain. Indeed, 3 hours after the last treatment injection, RBV quantified in the brain is not significantly higher in complex-treated mice group. This could not be explained by a delayed response, since it has been proved 5 hours after the last injection. Accumulation of RBV in mice brain, even in the free RBV-treated group, could explain that the difference between pharmacokinetic profiles diminished after several days of treatment.RBV quantity in the brain has also been demonstrated to be higher at day 5 compared to day 1 after daily small particle aerosol administration (Gilbert et al., 1991). Moreover, effects of cyclodextrin multiple injections or long-term toxicity on the BBB have not yet been studied. The hypothesis of an efflux of RBV due to cyclodextrin-mediated changes of the BBB should have to be explored in further in vitro studies.

Our results confirm that RBV reaches effective concentration into mouse brain only when it is administered in a complex formulation form and explain the advantage of the complex RBV/α-CD over RBV in protecting mice from intracerebral infection with MV (Jeulin et al., 2008). These results confirm that cyclodextrins are of a great interest for the treatment of human infectious diseases of central nervous system, in particular, many worrisome viral encephalitis which are due to highly pathogenic RNA virus sensitive to RBV, including West Nile, tick borne encephalitis, Japanese encephalitis or Rift valley fever virus (Canonico et al., 1984; Crance et al., 2003; Day et al., 2005). In the same way, cyclodextrin could improve SSPE treatment, since the success of treatment has been demonstrated to rest on RBV concentration in cerebrospinal fluid (Hosoya et al., 2004).

To our knowledge, no other in vivo study has described benefit of alpha-cyclodextrin for drug delivery to the brain. Even if the mechanism of action of cyclodextrin needs to be elucidated, this animal model revealed the virological and pharmacological interests of α-CD as a drug carrier for central nervous system disorders.

References

Avison, M.J., Nath, A., Greene-Avison, R., Schmitt, F.A., Greenberg, R.N., Berger, J.R., 2004. Neuroimaging correlates of HIV-associated BBB compromise. J. Neuroimmunol. 157**,** 140-146.

Bussereau, F., Picard, M., Blancou, J., Sureau, P., 1988. Treatment of rabies in mice and foxes with antiviral compounds. Acta. Virol. 32**,** 33-49.

Canonico, P.G., Kende, M., Luscri, B.J., Huggins, J.W., 1984. In-vivo activity of antivirals against exotic RNA viral infections. J. Antimicrob. Chemother. 14 Suppl A**,** 27-41.

Crance, J.M., Scaramozzino, N., Jouan, A., Garin, D., 2003. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. Antiviral Res. 58**,** 73-79.

Day, C.W., Smee, D.F., Julander, J.G., Yamshchikov, V.F., Sidwell, R.W., Morrey, J.D., 2005. Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. Antiviral Res. 67**,** 38-45.

Ferrara, E.A., Oishi, J.S., Wannemacher, R.W., Jr., Stephen, E.L., 1981. Plasma disappearance, urine excretion, and tissue distribution of ribavirin in rats and rhesus monkeys. Antimicrob. Agents Chemother. 19**,** 1042-1049.

Gilbert, B.E., Wyde, P.R., 1988. Pharmacokinetics of ribavirin aerosol in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 32**,** 117-121.

Gilbert, B.E., Wyde, P.R., Wilson, S.Z., Robins, R.K., 1991. Aerosol and intraperitoneal administration of ribavirin and ribavirin triacetate: pharmacokinetics and protection of

mice against intracerebral infection with influenza A/WSN virus. Antimicrob. Agents Chemother. 35**,** 1448-1453.

Grancher, N., Kedzierewicz, F., Venard, V., Marsura, A., Finance, C., Le Faou, A., 2005. Physicochemical Study of Ribavirin Complexes with alpha-, beta- and gamma-Cyclodextrins. J. Incl. Phenom. Macroc. Chem. 51**,** 149-157.

Grancher, N., Venard, V., Kedzierewicz, F., Ammerlaan, W., Finance, C., Muller, C.P., Le Faou, A., 2004. Improved antiviral activity *in vitro* of ribavirin against measles virus after complexation with cyclodextrins. Antiviral Res. 62**,** 135-137.

Homma, M., Jayewardene, A.L., Gambertoglio, J., Aweeka, F., 1999. High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in whole blood to assess disposition in erythrocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 43**,** 2716-2719.

Honda, Y., Hosoya, M., Ishii, T., Shigeta, S., Suzuki, H., 1994. Effect of ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis virus infections in hamsters. Antimicrob. Agents Chemother. 38**,** 653-655.

Hosoya, M., Mori, S., Tomoda, A., Mori, K., Sawaishi, Y., Kimura, H., Shigeta, S., Suzuki, H., 2004. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. Antimicrob. Agents Chemother. 48**,** 4631-4635.

Huffman, J.H., Sidwell, R.W., Khare, G.P., Witkowski, J.T., Allen, L.B., Robins, R.K., 1973. *In vitro* effect of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. Antimicrob. Agents Chemother. 3**,** 235-241.

Jeulin, H., Grancher, N., Kedzierewicz, F., Finance, C., Le Faou, A.E., Venard, V., 2008. In vivo antiviral activity of ribavirin/alpha-cyclodextrin complex: Evaluation on experimental measles virus encephalitis in mice. Int. J. Pharm. 357**,** 148-153.

Jeulin, H., Grancher, N., Kedzierewicz, F., Le Faou, A.E., Venard, V., 2006. Evaluation by Q-RTPCR of the efficacy of ribavirin complexed with beta-cyclodextrin against measles virus in a mouse encephalitis model. Pathol. Biol. (Paris) 54**,** 541-544.

Loftsson, T., Brewster, M.E., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. J. Pharm. Sci. 85**,** 1017-1025.

Loftsson, T., Duchene, D., 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. Int. J. Pharm. 329**,** 1-11.

Loftsson, T., Vogensen, S.B., Brewster, M.E., Konradsdottir, F., 2007. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. J. Pharm. Sci. 96**,** 2532-2546.

Monnaert, V., Betbeder, D., Fenart, L., Bricout, H., Lenfant, A.M., Landry, C., Cecchelli, R., Monflier, E., Tilloy, S., 2004a. Effects of gamma- and hydroxypropyl-gamma-cyclodextrins on the transport of doxorubicin across an in vitro model of blood-brain barrier. J. Pharmacol. Exp. Ther. 311**,** 1115-1120.

Monnaert, V., Tilloy, S., Bricout, H., Fenart, L., Cecchelli, R., Monflier, E., 2004b. Behavior of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier. J. Pharmacol. Exp. Ther. 310**,** 745-751.

Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., Kanmogne, G.D., 2006. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. J. Neuroimmune. Pharmacol. 1**,** 223-236.

Sidwell, R.W., Allen, L.B., Khare, G.P., Huffman, J.H., Witkowski, J.T., Simon, L.N., Robins, R.K., 1973. Effect of 1-beta-D-ribofuranosyl1-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on herpes and vaccinia keratitis and encephalitis in laboratory animals. Antimicrob. Agents Chemother. 3**,** 242-246.

Stoll, M.S., Hounsell, E.F., 1988. Selective purification of reduced oligosaccharides using a phenylboronic acid bond elut column: potential application in HPLC, mass spectrometry, reductive amination procedures and antigenic/serum analysis. Biomed. Chromatogr. 2**,** 249-253.

Tilloy, S., Monnaert, V., Fenart, L., Bricout, H., Cecchelli, R., Monflier, E., 2006. Methylated beta-cyclodextrin as P-gp modulators for deliverance of doxorubicin across an in vitro model of blood-brain barrier. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16**,** 2154-2157.

Uekama, K., Otagiri, M., 1987. Cyclodextrins in drug carrier systems. Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst. 3**,** 1-40.

Wyde, P.R., Moore-Poveda, D.K., De Clercq, E., Neyts, J., Matsuda, A., Minakawa, N., Guzman, E., Gilbert, B.E., 2000. Use of cotton rats to evaluate the efficacy of antivirals in treatment of measles virus infections. Antimicrob. Agents Chemother. 44**,** 1146-1152.

Wyshak, G., Detre, K., 1972. Estimating the number of organisms in quantal assays. Appl. Microbiol. 23**,** 784-790.

Figure 1.

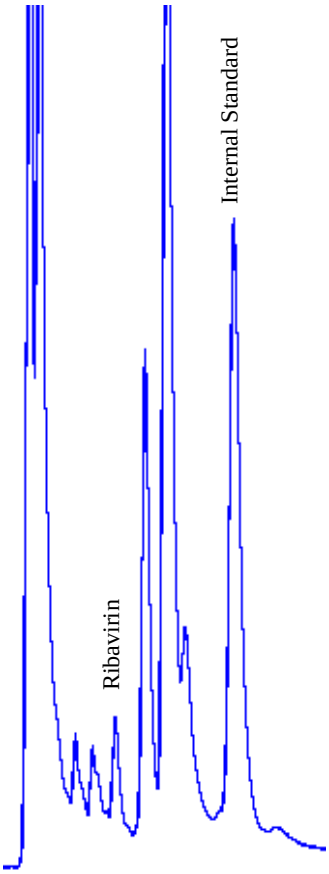


Figure 1. Chromatogram of a brain extract from intraperitoneal ribavirin-treated mice (40 mg/kg), 12 hours after injection. Internal standard (3-methylcytidine methosulfate) was added before solid-phase extraction.

Figure 2a.

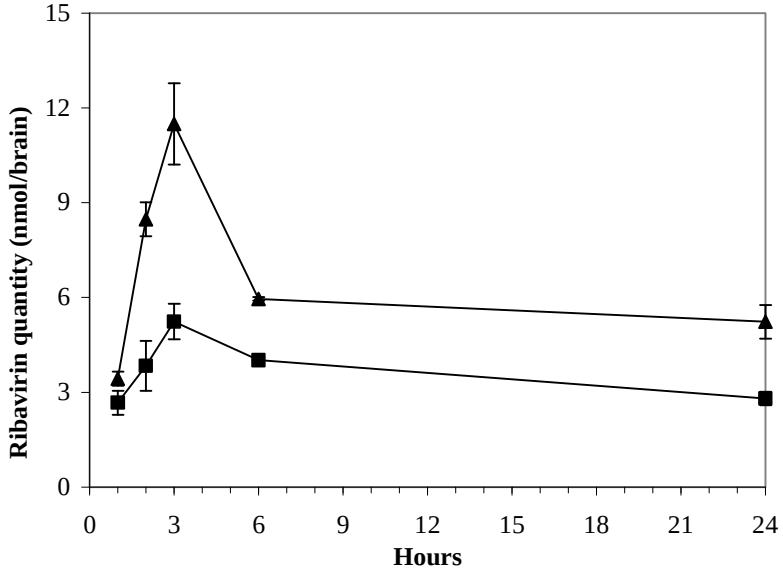


Figure 2b.

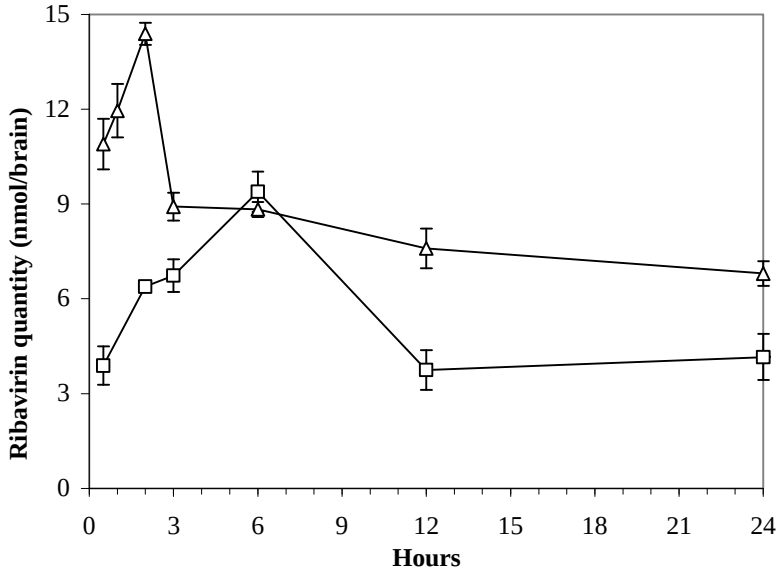


Figure 2. Pharmacokinetics of ribavirin in brain tissue of healthy mice after (2a) a single intraperitoneal injection of (■) ribavirin (40 mg/kg) or (▲) ribavirin/alpha-cyclodextrin complex (40 mg/kg of ribavirin), or (2b) after a single intraperiotoneal injection of (□) ribavirin (100 mg/kg) or (△) ribavirin/alpha-cyclodextrin complex (100 mg/kg of ribavirin). Values represent the means found for three mice ± standard deviation.

Figure 3a.

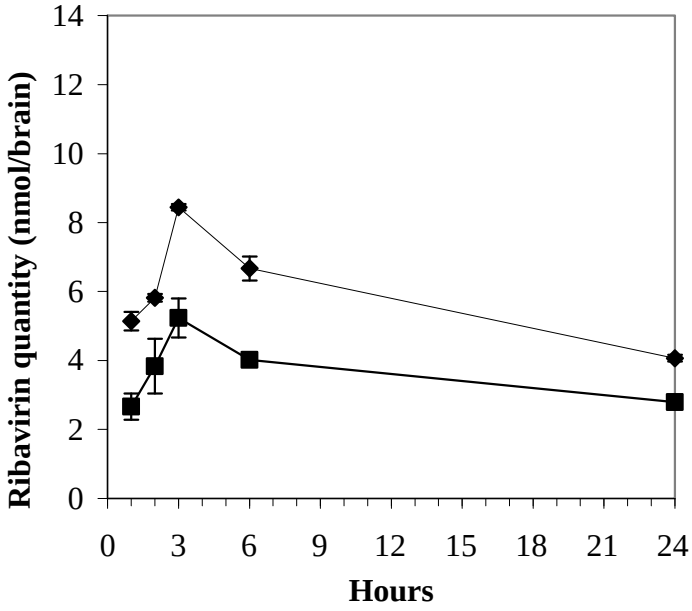


Figure 3b.

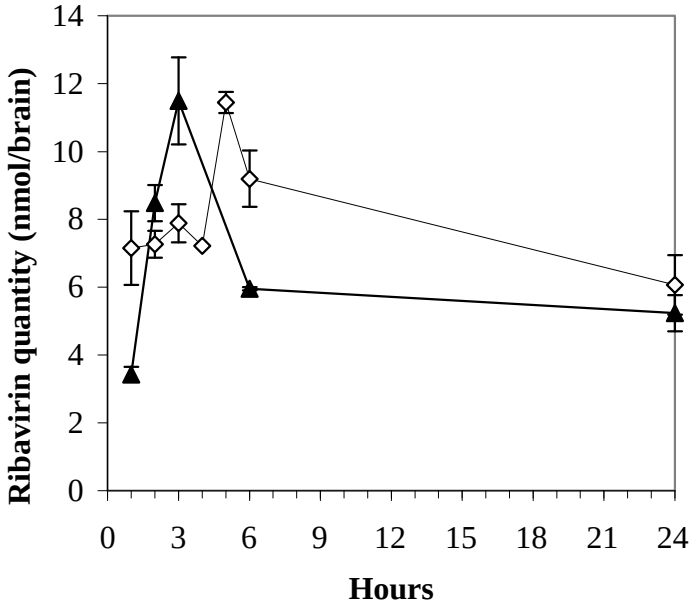


Figure 3. Pharmacokinetics of ribavirin in brain tissue after (3a) a single intraperitoneal injection of ribavirin (40 mg/kg) in healthy (■) or CAM/RB strain of measles virus intracranially infected mice (◆), or (3b) after a single intraperitoneal injection ribavirin/alpha-cyclodextrin complex (40 mg/kg of ribavirin) in healthy (▲) or CAM/RB strain of measles virus intracranially infected mice (◇). Values represent the means found for three mice ± standard deviation.

Figure 4.

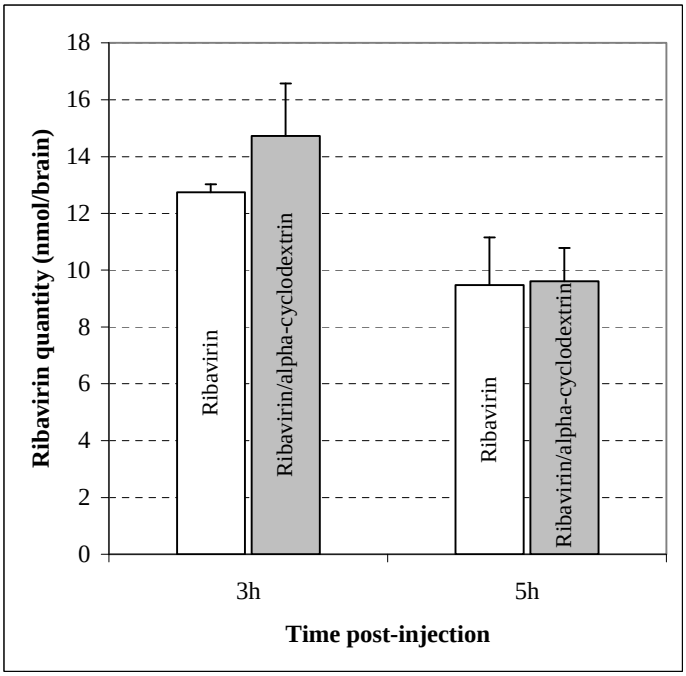


Figure 4. Ribavirin quantities in brain tissue of infected mice, treated daily (from day -1 to day 4) by intraperitoneal injection of free ribavirin (40 mg/kg) or the complex ribavirin/alpha-cyclodextrin (40 mg/kg of ribavirin). Mice were intracranially injected with the measles virus CAM/RB strain on day 0. Ribavirin was extracted 3 or 5 hours after the last injection, on day 4. Values represent the means found for three mice ± standard deviation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail nous avons pu démontrer sur un modèle animal d'encéphalite rougeoleuse que l'activité antivirale de la ribavirine est améliorée lorsque la molécule est administrée sous forme de complexe avec l'alpha-cyclodextrine. La complexation de la ribavirine à l'alpha-cyclodextrine a permis une diminution de la morbidité et de la mortalité des souris traitées, associée à une diminution précoce de la charge virale dans le cerveau. De plus, chez les souris saines comme chez les souris infectées, la quantité de ribavirine présente dans le cerveau est significativement augmentée lorsque le traitement est injecté sous la forme d'un complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine, par comparaison à une injection de ribavirine libre à la même dose. L'augmentation de la quantité de ribavirine présente dans le cerveau explique l'amélioration de l'activité antivirale décrite à l'aide du modèle animal d'encéphalite rougeoleuse. Le bénéfice du traitement par le complexe ribavirine/bêta-cyclodextrine, démontré *in vitro*, n'a pas été confirmé *in vivo*, probablement en raison d'une constante de stabilité du complexe trop élevée.

La mise en place de ce modèle animal a ainsi permis de démontrer l'intérêt virologique et pharmacologique de la complexation de la ribavirine à l'alpha-cyclodextrine. Ces résultats confirment les capacités potentielles des cyclodextrines à être des vecteurs pour les médicaments des pathologies du SNC.

Des données récentes de la littérature sur le rôle des cyclodextrines ont amené l'hypothèse d'une action directe des cyclodextrines sur une barrière hémato-encéphalique artificielle, facilitant le passage de la molécule hôte, que celle-ci soit administrée de façon concomitante ou sous forme complexée [Tilloy et al., 2006]. Dans notre modèle, la confirmation de cette hypothèse nécessiterait une étude pharmacocinétique complète pour mesurer les quantités de ribavirine et de cyclodextrine, libres ou complexées, dans le compartiment sanguin de la souris, ainsi qu'une étude virologique sur l'activité antivirale de la ribavirine administrée de façon concomitante à l'alpha-cyclodextrine.

Il serait également intéressant de réaliser une étude *in vitro* de ces molécules sur un modèle de BHE tel que celui développé par l'équipe de Cechelli [Cecchelli et al., 1999], et de confronter les résultats avec ceux obtenus *in vivo* afin de réaliser une corrélation entre les deux modèles. Car même si le modèle *in vivo* est plus proche de la réalité, les résultats sont grevés d'une variabilité inhérente à l'utilisation d'êtres vivants que l'utilisation de souris consanguines ne suffit pas à éliminer.

Le développement de nouvelles molécules antivirales ou, comme ici, l'amélioration des propriétés pharmacologiques d'une molécule existante sont des travaux complexes nécessitant l'utilisation de méthodes physicochimiques, virologiques et pharmacologiques. Ainsi tout nouveau développement autour des expériences déjà réalisées avec les cyclodextrines natives et la ribavirine sur le virus de la rougeole nécessite un travail approfondi d'adaptation des techniques. Ainsi, pour tester de nouvelles cyclodextrines modifiées, il faut réaliser la caractérisation physicochimique des nouveaux complexes avec la ribavirine ; l'adaptation du modèle animal à un autre virus plus pathogène peut nécessiter un changement d'espèce animale ou de race de souris et éventuellement la mise en place de conditions expérimentales en laboratoire de sécurité de niveau 3 ; l'utilisation d'une autre molécule antivirale nécessite l'adaptation de la méthode d'extraction, à partir du tissu cérébral. Toutes ces déclinaisons de l'étude réalisée au cours de notre travail sont particulièrement intéressantes et chacune devra être étudiée successivement.

Finalement, en dépit du grand nombre de cibles virales potentielles, la ribavirine reste peu utilisée à ce jour en raison de sa mauvaise biodisponibilité. Puisque la plupart des virus émergents et hautement pathogènes sont et continueront probablement à être des virus à ARN, potentiellement sensibles à la ribavirine, cet analogue nucléosidique, décrit dès 1972, reste une molécule d'actualité Etant donné le temps nécessaire au développement de nouvelles molécules, l'amélioration des propriétés pharmacologiques des molécules existantes est primordiale, notamment pour ce qui concerne l'accès des molécules au cerveau. Dans ce domaine, les cyclodextrines sont une solution d'avenir, comme nous avons su le démontrer.

REFERENCES

Abel, S., Allan, R., Gandelman, K., Tomaszewski, K., Webb, D.J., Wood, N.D., **2008**. Pharmacokinetics, safety and tolerance of voriconazole in renally impaired subjects: two prospective, multicentre, open-label, parallel-group volunteer studies. *Clin Drug Investig* 28**,** 409-420.

Agut, H. (**2003**) Infections du système nerveux central. In: *Traité de virologie médicale* (ed. by Estem), pp. 627-630. De Boeck, Paris.

Aimé-Genty, N. (1997) *Le cerveau : Dictionnaire encyclopédique.* Vuibert.

Albright, A.V., Soldan, S.S., Gonzalez-Scarano, F., **2003**. Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J Neurovirol* 9**,** 222-227.

Alenius, S., **1980**. Inhibition of herpesvirus multiplication in guinea pig skin by antiviral compounds. *Arch Virol* 65**,** 149-156.

Ambrose, Z., Compton, L., Piatak, M., Jr., Lu, D., Alvord, W.G., Lubomirski, M.S., Hildreth, J.E., Lifson, J.D., Miller, C.J., KewalRamani, V.N., **2008**. Incomplete protection against simian immunodeficiency virus vaginal transmission in rhesus macaques by a topical antiviral agent revealed by repeat challenges. *J Virol* 82**,** 6591-6599.

Andrei, G., Snoeck, R., Vandeputte, M., De Clercq, E., **1997**. Activities of various compounds against murine and primate polyomaviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 41**,** 587-593.

Arribas, J.R., Storch, G.A., Clifford, D.B., Tselis, A.C., **1996**. Cytomegalovirus encephalitis. *Ann Intern Med* 125**,** 577-587.

Asaria, P., MacMahon, E., **2006**. Measles in the United Kingdom: can we eradicate it by 2010? *Bmj* 333**,** 890-895.

Avison, M.J., Nath, A., Greene-Avison, R., Schmitt, F.A., Greenberg, R.N., Berger, J.R., **2004**. Neuroimaging correlates of HIV-associated BBB compromise. *J Neuroimmunol* 157**,** 140-146.

Babu, R.J., Dhanasekaran, M., Vaithiyalingam, S.R., Singh, P.N., Pandit, J.K., **2008**. Cardiovascular effects of transdermally delivered bupranolol in rabbits: effect of chemical penetration enhancers. *Life Sci* 82**,** 273-278.

Barnard, D.L., **2004**. Inhibitors of measles virus. *Antivir Chem Chemother* 15**,** 111-119.

Barzo, P., Marmarou, A., Fatouros, P., Corwin, F., Dunbar, J., **1996**. Magnetic resonance imaging-monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg* 85**,** 1113-1121.

Beigel, J., Bray, M., **2008**. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res* 78**,** 91-102.

Bellini, W.J., Rota, J.S., Lowe, L.E., Katz, R.S., Dyken, P.R., Zaki, S.R., Shieh, W.J., Rota, P.A., **2005**. Subacute sclerosing panencephalitis: more cases of this fatal disease are prevented by measles immunization than was previously recognized. *J Infect Dis* 192**,** 1686-1693.

Bhagrath, M., Sidwell, R., Czako, K., Seyda, K., Anderson, W., Bodo, N., Brewster, M.E., **1991**. Improved delivery through biological membranes. Synthesis, characterization and antiviral

activity of a series of ribavirin chemical delivery systems: 5' carboxamide derivatives. *Antivir Chem Chemother* 2**,** 265-286.

Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Ricci, M., Rossi, C., **2007**. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 59**,** 454-477.

Brewster, M.E., Loftsson, T., **2007**. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 59**,** 645-666.

Bussereau, F., Picard, M., Blancou, J., Sureau, P., **1988**. Treatment of rabies in mice and foxes with antiviral compounds. *Acta. Virol.* 32**,** 33-49.

Canonico, P.G., Kende, M., Luscri, B.J., Huggins, J.W., **1984**. In-vivo activity of antivirals against exotic RNA viral infections. *J Antimicrob Chemother* 14 Suppl A**,** 27-41.

Carrigan, D.R., **1997**. Adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am J Med* 102**,** 71-74.

Carvey, P.M., Zhao, C.H., Hendey, B., Lum, H., Trachtenberg, J., Desai, B.S., Snyder, J., Zhu, Y.G., Ling, Z.D., **2005**. 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. *Eur J Neurosci* 22**,** 1158-1168.

Casolari, S., Briganti, E., Zanotti, M., Zauli, T., Nicoletti, L., Magurano, F., Fortuna, C., Fiorentini, C., Grazia Ciufolini, M., Rezza, G., **2008**. A fatal case of encephalitis associated with Chikungunya virus infection. *Scand J Infect Dis* 1-2.

Cattaneo, R., Schmid, A., Eschle, D., Baczko, K., ter Meulen, V., Billeter, M.A., **1988**. Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* 55**,** 255-265.

Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buee-Scherrer, V., Duhem, C., Lundquist, S., Rentfel, M., Torpier, G., Dehouck, M.P., **1999**. *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 36**,** 165-178.

Chadha, M.S., Comer, J.A., Lowe, L., Rota, P.A., Rollin, P.E., Bellini, W.J., Ksiazek, T.G., Mishra, A., **2006**. Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India. *Emerg Infect Dis* 12**,** 235-240.

Chavanpatil, M.D., Vavia, P.R., **2004**. The influence of absorption enhancers on nasal absorption of acyclovir. *Eur J Pharm Biopharm* 57**,** 483-487.

Crance, J.M., Scaramozzino, N., Jouan, A., Garin, D., **2003**. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res* 58**,** 73-79.

Crotty, S., Andino, R., **2002**. Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microbes Infect* 4**,** 1301-1307.

Crotty, S., Maag, D., Arnold, J.J., Zhong, W., Lau, J.Y., Hong, Z., Andino, R., Cameron, C.E., **2000**. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 6**,** 1375-1379.

Crumpacker, C., Bubley, G., Lucey, D., Hussey, S., Connor, J., **1986**. Ribavirin enters cerebrospinal fluid. *Lancet* 2**,** 45-46.

Davis, L.E., Beckham, J.D., Tyler, K.L., **2008**. North American encephalitic arboviruses. *Neurol Clin* 26**,** 727-757, ix.

Day, C.W., Smee, D.F., Julander, J.G., Yamshchikov, V.F., Sidwell, R.W., Morrey, J.D., **2005**. Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res* 67**,** 38-45.

de Boer, A.G., Gaillard, P.J., **2007a**. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47**,** 323-355.

de Boer, A.G., Gaillard, P.J., **2007b**. Strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier. *Clin Pharmacokinet* 46**,** 553-576.

De Clercq, E., Luczak, M., Shugar, D., Torrence, P.F., Waters, J.A., Witkop, B., **1976**. Effect of cytosine, arabinoside, iododeoxyuridine, ethyldeoxyuridine, thiocyanatodeoxyuridine, and ribavirin on tail lesion formation in mice infected with vaccinia virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 151**,** 487-490.

Defaye, J., Garcia Fernandez, J.M., Ortiz Mellet, C., **2007**. [Pharmaceutical use of cyclodextrines: perspectives for drug targeting and control of membrane interactions]. *Ann Pharm Fr* 65**,** 33-49.

Del Valle, E.M.M., **2004**. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 39**,** 1033-1046.

Desjardin, J.A., Snydman, D.R., **1998**. Antiviral immunotherapy: a review of current status. *BioDrugs* 9**,** 487-507.

Devaux, P., Cattaneo, R., **2004**. Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol* 78**,** 11632-11640.

Di Stefano, G., Colonna, F.P., Bongini, A., Busi, C., Mattioli, A., Fiume, L., **1997**. Ribavirin conjugated with lactosaminated poly-L-lysine: selective delivery to the liver and increased antiviral activity in mice with viral hepatitis. *Biochem Pharmacol* 54**,** 357-363.

Dubberke, E.R., Tu, B., Rivet, D.J., Storch, G.A., Apisarnthanarak, A., Schmidt, R.E., Weiss, S., Polish, L.B., **2006**. Acute meningoencephalitis caused by adenovirus serotype 26. *J Neurovirol* 12**,** 235-240.

Duclos-vallée, J., Samuel, D., **2001**. La ribavirine. *Médecine thérapeutique / pédiatrie* 4**,** 53-57.

Duke, T., Mgone, C.S., **2003**. Measles: not just another viral exanthem. *Lancet* 361**,** 763-773.

Duprex, W.P., Duffy, I., McQuaid, S., Hamill, L., Cosby, S.L., Billeter, M.A., Schneider-Schaulies, J., ter Meulen, V., Rima, B.K., **1999**. The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain. *J Virol* 73**,** 6916-6922.

El-Kamel, A.H., Abdel-Aziz, A.A., Fatani, A.J., El-Subbagh, H.I., **2008**. Oral colon targeted delivery systems for treatment of inflammatory bowel diseases: Synthesis, in vitro and in vivo assessment. *Int J Pharm* 358**,** 248-255.

Enders, J.F., Peebles, T.C., McCarthy, K., Milovanovic, M., Mitus, A., Holloway, A., **1957**. Measles virus: a summary of experiments concerned with isolation, properties, and behavior. *Am J Public Health Nations Health* 47**,** 275-282.

Ewing, J.R., Knight, R.A., Nagaraja, T.N., Yee, J.S., Nagesh, V., Whitton, P.A., Li, L., Fenstermacher, J.D., **2003**. Patlak plots of Gd-DTPA MRI data yield blood-brain transfer constants concordant with those of 14C-sucrose in areas of blood-brain opening. *Magn Reson Med* 50**,** 283-292.

Fang, C., Srivastava, P., Lin, C.C., **2003**. Effect of ribavirin, levovirin and viramidine on liver toxicological gene expression in rats. *J Appl Toxicol* 23**,** 453-459.

Farkas, G., Marton, J., Nagy, Z., Mandi, Y., Takacs, T., Deli, M.A., Abraham, C.S., **1998**. Experimental acute pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in the rat: a potential role for tumor necrosis factor and interleukin 6. *Neurosci Lett* 242**,** 147-150.

Ferrara, E.A., Oishi, J.S., Wannemacher, R.W., Jr., Stephen, E.L., **1981**. Plasma disappearance, urine excretion, and tissue distribution of ribavirin in rats and rhesus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 19**,** 1042-1049.

Fiume, L., Di Stefano, G., Busi, C., Incitti, F., Rapicetta, M., Farina, C., Gervasi, G.B., Bonino, F., **1998**. Coupling to lactosaminated poly-L-lysine reduces the toxic effects of ribavirin on red blood cells. *J Hepatol* 29**,** 1032-1033.

Forni, A.L., Schluger, N.W., Roberts, R.B., **1994**. Severe measles pneumonitis in adults: evaluation of clinical characteristics and therapy with intravenous ribavirin. *Clin. Infect. Dis.* 19**,** 454-462.

Fowler, A., Stodberg, T., Eriksson, M., Wickstrom, R., **2008**. Childhood encephalitis in Sweden: Etiology, clinical presentation and outcome. *Eur J Paediatr Neurol.*

Frank, D.W., Gray, J.E., Weaver, R.N., **1976**. Cyclodextrin nephrosis in the rat. *Am J Pathol* 83**,** 367-382.

Frederic, B., Malika, L.S., Marie, H., Eric, M., Philippe, A., Mohamed, S., **2008**. Percutaneous absorption of metopimazine and effect of cyclodextrins. *Drug Dev Ind Pharm* 34**,** 478-484.

Freymuth, F. (**2003**) Paramyxoviridae. In: *Traité de virologie médicale* (ed. by Estem), pp. 459-480. De Boeck, Paris.

Gaber, M.W., Yuan, H., Killmar, J.T., Naimark, M.D., Kiani, M.F., Merchant, T.E., **2004**. An intravital microscopy study of radiation-induced changes in permeability and leukocyte-endothelial cell interactions in the microvessels of the rat pia mater and cremaster muscle. *Brain Res Brain Res Protoc* 13**,** 1-10.

Gardner, C.L., Burke, C.W., Tesfay, M.Z., Glass, P.J., Klimstra, W.B., Ryman, K.D., **2008**. Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis. *J Virol* 82**,** 10634-10646.

Garmashova, N., Atasheva, S., Kang, W., Weaver, S.C., Frolova, E., Frolov, I., **2007**. Analysis of Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein function in the inhibition of cellular transcription. *J Virol* 81**,** 13552-13565.

Gilbert, B.E., Wilson, S.Z., Knight, V., Couch, R.B., Quarles, J.M., Dure, L., Hayes, N., Willis, G., **1985**. Ribavirin small-particle aerosol treatment of infections caused by influenza virus strains A/Victoria/7/83 (H1N1) and B/Texas/1/84. *Antimicrob Agents Chemother* 27**,** 309-313.

Gilbert, B.E., Wyde, P.R., **1988**. Pharmacokinetics of ribavirin aerosol in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 32**,** 117-121.

Gilbert, B.E., Wyde, P.R., Wilson, S.Z., Robins, R.K., **1991**. Aerosol and intraperitoneal administration of ribavirin and ribavirin triacetate: pharmacokinetics and protection of mice against intracerebral infection with influenza A/WSN virus. *Antimicrob Agents Chemother* 35**,** 1448-1453.

Glaser, C.A., Honarmand, S., Anderson, L.J., Schnurr, D.P., Forghani, B., Cossen, C.K., Schuster, F.L., Christie, L.J., Tureen, J.H., **2006**. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis* 43**,** 1565-1577.

Glue, P., **1999**. The clinical pharmacology of ribavirin. *Semin Liver Dis* 19**,** 17-24.

Gonzalez, J.R., Baiza-Duran, L., Quintana-Hau, J., Tornero-Montano, R., Castaneda-Hernandez, G., Ortiz, M., Alarcon-Oceguera, F., Beltran-Loustaunau, M., Cortez-Gastelum, M., Garciduenas-Mejia, J., Gomez-Bastar, P., Jimenez-Roman, J., Korder-Ortega, V., Paczka-Zapata, J., Torres-Segura, M., Velasco-Gallegos, G., **2007**. Comparison of the stability, efficacy, and adverse effect

profile of the innovator 0.005% latanoprost ophthalmic solution and a novel cyclodextrin-containing formulation. *J Clin Pharmacol* 47**,** 121-126.

Graci, J.D., Cameron, C.E., **2006**. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* 16**,** 37-48.

Grancher, N. (2005) *Vectorisation de la ribavirine par les cyclodextrines : Caractérisation physico-chimique des complexes et activité antivirale in vitro et in vivo sur le virus de la rougeole.* In: Ecole doctorale "Biologie, santé et environnement", p. 198. Université Henri Poincaré, Nancy.

Grancher, N., Kedzierewicz, F., Venard, V., Marsura, A., Finance, C., Le Faou, A., **2005**. Physicochemical Study of Ribavirin Complexes with alpha-, beta- and gamma-Cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* 51**,** 149-157.

Grancher, N., Venard, V., Kedzierewicz, F., Ammerlaan, W., Finance, C., Muller, C.P., Le Faou, A., **2004**. Improved antiviral activity in vitro of ribavirin against measles virus after complexation with cyclodextrins. *Antiviral Res* 62**,** 135-137.

Griffin, D.E. (**1995**) Measles Virus. In: *Fields Virology* (ed. by F. B.N.), Vol. 1, pp. 1267-1312. Lippincott - Raven, New York.

Griffin, D.E. (**2000**) Encephalitis, myelitis, and neuritis. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* (ed. by G.L. Mandell, J.E. Bennett & R. Dolin), Vol. 1, pp. 1009-1016. Churchill livingstone.

Guler, E., Davutoglu, M., Guler, S., Citirik, D., Karabiber, H., **2007**. Encephalitis in a Child during Atypical Course of Rubella. *Infection*.

Haas, W.H., Breuer, T., Pfaff, G., Schmitz, H., Kohler, P., Asper, M., Emmerich, P., Drosten, C., Golnitz, U., Fleischer, K., Gunther, S., **2003**. Imported Lassa fever in Germany: surveillance and management of contact persons. *Clin Infect Dis* 36**,** 1254-1258.

Halsey, N.A., **2006**. Measles in developing countries. *Bmj* 333**,** 1234.

Hausler, M., Schaade, L., Kemeny, S., Schweizer, K., Schoenmackers, C., Ramaekers, V.T., **2002**. Encephalitis related to primary varicella-zoster virus infection in immunocompetent children. *J Neurol Sci* 195**,** 111-116.

Hawkins, B.T., Egleton, R.D., **2008**. Pathophysiology of the blood-brain barrier: animal models and methods. *Curr Top Dev Biol* 80**,** 277-309.

Hawkins, B.T., Lundeen, T.F., Norwood, K.M., Brooks, H.L., Egleton, R.D., **2007**. Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia* 50**,** 202-211.

Higuchi, T., Connors, K.A. (**1965**) Phase solubility techniques. In: *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, pp. 117-212. Reilley, C.N. (Ed.).

Hirsch, M.S., Kaplan, J.C., **1987**. Treatment of human immunodeficiency virus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 31**,** 839-843.

Holbrook, M.R., Gowen, B.B., **2008**. Animal models of highly pathogenic RNA viral infections: Encephalitis viruses. *Antiviral Res* 78**,** 69-78.

Homma, M., Jayewardene, A.L., Gambertoglio, J., Aweeka, F., **1999**. High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in whole blood to assess disposition in erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 43**,** 2716-2719.

Honda, Y., Hosoya, M., Ishii, T., Shigeta, S., Suzuki, H., **1994**. Effect of ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis virus infections in hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38**,** 653-655.

Hooper, P., Zaki, S., Daniels, P., Middleton, D., **2001**. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3**,** 315-322.

Horikami, S.M., Moyer, S.A., **1995**. Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 191**,** 35-50.

Hosoya, M., Mori, S., Tomoda, A., Mori, K., Sawaishi, Y., Kimura, H., Shigeta, S., Suzuki, H., **2004**. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 48**,** 4631-4635.

Hosoya, M., Shigeta, S., Mori, S., Tomoda, A., Shiraishi, S., Miike, T., Suzuki, H., **2001**. High-dose intravenous ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 45**,** 943-945.

Hovgaard, L., Brondsted, H., **1995**. Drug delivery studies in Caco-2 monolayers. IV. Absorption enhancer effects of cyclodextrins. *Pharm Res* 12**,** 1328-1332.

Huang, P., Xu, W., Yoon, S.I., Chen, C., Chong, P.L., Liu-Chen, L.Y., **2007**. Cholesterol reduction by methyl-beta-cyclodextrin attenuates the delta opioid receptor-mediated signaling in neuronal cells but enhances it in non-neuronal cells. *Biochem Pharmacol* 73**,** 534-549.

Huber, J.D., VanGilder, R.L., Houser, K.A., **2006**. Streptozotocin-induced diabetes progressively increases blood-brain barrier permeability in specific brain regions in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291**,** H2660-2668.

Huffman, J.H., Sidwell, R.W., Khare, G.P., Witkowski, J.T., Allen, L.B., Robins, R.K., **1973**. In vitro effect of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 3**,** 235-241.

Huiming, Y., Chaomin, W., Meng, M., **2005**. Vitamin A for treating measles in children. *Cochrane Database Syst Rev* CD001479.

Invs, **2008**. Calendrier vaccinal 2008 - Avis du Haut conseil de la santé publique. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 26-17**,** 133.

Irie, T., Kuwahara, S., Otagiri, M., Uekama, K., Iwamasa, T., **1983**. Reduction in the local tissue toxicity of chlorpromazine by beta-cyclodextrin complexation. *J Pharmacobiodyn* 6**,** 790-792.

Irie, T., Uekama, K., **1997**. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* 86**,** 147-162.

Ishii, T., Hosoya, M., Mori, S., Shigeta, S., Suzuki, H., **1996**. Effective ribavirin concentration in hamster brains for antiviral chemotherapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 40**,** 241-243.

Jalalipour, M., Najafabadi, A.R., Gilani, K., Esmaily, H., Tajerzadeh, H., **2008**. Effect of dimethyl-beta-cyclodextrin concentrations on the pulmonary delivery of recombinant human growth hormone dry powder in rats. *J Pharm Sci*.

Jeulin, H., Grancher, N., Kedzierewicz, F., Finance, C., Le Faou, A.E., Venard, V., **2008**. In vivo antiviral activity of ribavirin/alpha-cyclodextrin complex: evaluation on experimental measles virus encephalitis in mice. *Int J Pharm* 357**,** 148-153.

Jeulin, H., Grancher, N., Kedzierewicz, F., Le Faou, A.E., Venard, V., **2006**. Evaluation by Q-RTPCR of the efficacy of ribavirin complexed with beta-cyclodextrin against measles virus in a mouse encephalitis model. *Pathol Biol* 54**,** 541-544.

Juhler, M., Barry, D.I., Offner, H., Konat, G., Klinken, L., Paulson, O.B., **1984**. Blood-brain and blood-spinal cord barrier permeability during the course of experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Brain Res* 302**,** 347-355.

Kamberi, P., Sobel, R.A., Clemons, K.V., Waldvogel, A., Striebel, J.M., Williams, P.L., Stevens, D.A., **2007**. Comparison of itraconazole and fluconazole treatments in a murine model of coccidioidal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 51**,** 998-1003.

Khan, S.A., Patil, K.S., Yeole, P.G., **2008**. Intranasal mucoadhesive buspirone formulation: in vitro characterization and nasal clearance studies. *Pharmazie* 63**,** 348-351.

Kim, J.C., Kim, M.D., **2007**. After-rinsing hair growth promotion of minoxidil-containing amino alpha-cyclodextrins. *J Microbiol Biotechnol* 17**,** 1965-1969.

Kishimoto, C., Crumpacker, C.S., Abelmann, W.H., **1988**. Ribavirin treatment of murine coxsackievirus B3 myocarditis with analyses of lymphocyte subsets. *J Am Coll Cardiol* 12**,** 1334-1341.

Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Gilden, D.H., **2001**. The expanding spectrum of herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol* 11**,** 440-451.

Knight, R.A., Nagaraja, T.N., Ewing, J.R., Nagesh, V., Whitton, P.A., Bershad, E., Fagan, S.C., Fenstermacher, J.D., **2005**. Quantitation and localization of blood-to-brain influx by magnetic resonance imaging and quantitative autoradiography in a model of transient focal ischemia. *Magn Reson Med* 54**,** 813-821.

Koskiniemi, M., Rantalaiho, T., Piiparinen, H., von Bonsdorff, C.H., Farkkila, M., Jarvinen, A., Kinnunen, E., Koskiniemi, S., Mannonen, L., Muttilainen, M., Linnavuori, K., Porras, J., Puolakkainen, M., Raiha, K., Salonen, E.M., Ukkonen, P., Vaheri, A., Valtonen, V., **2001**. Infections of the central nervous system of suspected viral origin: a collaborative study from Finland. *J Neurovirol* 7**,** 400-408.

Kremer, J.R., Brown, K.E., Jin, L., Santibanez, S., Shulga, S.V., Aboudy, Y., Demchyshyna, I.V., Djemileva, S., Echevarria, J.E., Featherstone, D.F., Hukic, M., Johansen, K., Litwinska, B., Lopareva, E., Lupulescu, E., Mentis, A., Mihneva, Z., Mosquera, M.M., Muscat, M., Naumova, M.A., Nedeljkovic, J., Nekrasova, L.S., Magurano, F., Fortuna, C., de Andrade, H.R., Richard,

J.L., Robo, A., Rota, P.A., Samoilovich, E.O., Sarv, I., Semeiko, G.V., Shugayev, N., Utegenova, E.S., van Binnendijk, R., Vinner, L., Waku-Kouomou, D., Wild, T.F., Brown, D.W., Mankertz, A., Muller, C.P., Mulders, M.N., **2008**. High genetic diversity of measles virus, World Health Organization European Region, 2005-2006. *Emerg Infect Dis* 14**,** 107-114.

Kunze, U., **2006**. Tick-borne encephalitis--a European health challenge. Conference report of the 8th meeting of the International Scientific Working Group on Tick-borne Encephalitis (ISW TBE). *Wien Med Wochenschr* 156**,** 376-378.

Kuo, Y.C., Su, F.L., **2007**. Transport of stavudine, delavirdine, and saquinavir across the blood-brain barrier by polybutylcyanoacrylate, methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate, and solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 340**,** 143-152.

Lamb, R.A., Kolakoksky, D. (**1995**) Paramyxoviridae. In: *Fields Virology* (ed. by F. B.N.), Vol. 1, pp. 1177-1204. Lippincott - Raven, New York.

Lau, K.K., Lai, S.T., Lai, J.Y., Yan, W.W., So, T.M., Wong, T.Y., **1998**. Acute encephalitis complicating rubella. *Hong Kong Med J* 4**,** 325-328.

Leahy, T.R., Webb, D.W., Hoey, H., Butler, K.M., **2008**. Varicella zoster virus associated acute aseptic meningitis without exanthem in an immunocompetent 14-year-old boy. *Pediatr Infect Dis J* 27**,** 362-363.

Lee, S.H., Kim, Y.H., Yu, H.J., Cho, N.S., Kim, T.H., Kim, D.C., Chung, C.B., Hwang, Y.I., Kim, K.H., **2007**. Enhanced bioavailability of soy isoflavones by complexation with beta-cyclodextrin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 71**,** 2927-2933.

Lema, C.L., Cisterna, D.M., Freire, M.C., **2005**. [Neurologic disease due to adenovirus infection]. *Medicina (B Aires)* 65**,** 196-200.

Lenaerts, L., Naesens, L., **2006**. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res* 71**,** 172-180.

Li, F., Hong, L., Mau, C.I., Chan, R., Hendricks, T., Dvorak, C., Yee, C., Harris, J., Alfredson, T., **2006**. Transport of levovirin prodrugs in the human intestinal Caco-2 cell line. *J Pharm Sci* 95**,** 1318-1325.

Liebert, U.G., Baczko, K., Budka, H., ter Meulen, V., **1986**. Restricted expression of measles virus proteins in brains from cases of subacute sclerosing panencephalitis. *J Gen Virol* 67 (Pt 11)**,** 2435-2444.

Lin, C.C., Lourenco, D., Xu, G., Yeh, L.T., **2004**. Disposition and metabolic profiles of [14C]viramidine and [14C]ribavirin in rat and monkey red blood cells and liver. *Antimicrob Agents Chemother* 48**,** 1872-1875.

Lin, C.C., Xu, C., Zhu, N., Yeh, L.T., **2006**. Absorption, metabolism, and excretion of [14C]viramidine in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 50**,** 2368-2373.

Lindquist, L., Vapalahti, O., **2008**. Tick-borne encephalitis. *Lancet* 371**,** 1861-1871.

Loftsson, T., Brewster, M.E., **1996**. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci* 85**,** 1017-1025.

Loftsson, T., Duchene, D., **2007**. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 329**,** 1-11.

Loftsson, T., Stefansson, E., **2002**. Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. *Acta Ophthalmol Scand* 80**,** 144-150.

Loftsson, T., Vogensen, S.B., Brewster, M.E., Konradsdottir, F., **2007**. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J Pharm Sci* 96**,** 2532-2546.

Lohmann, C., Huwel, S., Galla, H.J., **2002**. Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: evaluation of different in vitro assays. *J Drug Target* 10**,** 263-276.

Magnussen, C.R., Douglas, R.G., Jr., Betts, R.F., Roth, F.K., Meagher, M.P., **1977**. Double-blind evaluation of oral ribavirin (Virazole) in experimental influenza A virus infection in volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 12**,** 498-502.

Mailles, A. (2005) *Encéphalites infectieuses en France : Les données du PMSI.* In: 25e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris.

Mailles, A., Stahl, J.P., Vaillant, V., Brouard, C., **2008**. [Epidemiology, improvment of etiological diagnosis, and outcome of infectious encephalitis in France in 2007: preliminary results of a national prospective study]. *Med Mal Infect* 38**,** S25-S38.

Masliah, E., DeTeresa, R.M., Mallory, M.E., Hansen, L.A., **2000**. Changes in pathological findings at autopsy in AIDS cases for the last 15 years. *Aids* 14**,** 69-74.

Matilainen, L., Toropainen, T., Vihola, H., Hirvonen, J., Jarvinen, T., Jarho, P., Jarvinen, K., **2008**. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *J Control Release* 126**,** 10-16.

Mazzeo, J.R., Krull, D.J., **1989**. Immobilized boronates for the isolation and separation of bioanalytes. *Biochromatography* 4**,** 124-130.

McCammon, J.R., Riesser, V.W., **1979**. Effects of ribavirin on BHK-21 cells acutely or persistently infected with mumps virus. *Antimicrob Agents Chemother* 15**,** 356-360.

McCormack, P.L., Scott, L.J., **2008**. Diclofenac sodium injection (Dyloject): in postoperative pain. *Drugs* 68**,** 123-130.

McNeill, W.H. (1976) *Plagues and peoples.* Anchor Press/Doubleday, New York.

Mendoza, L.P., Bronzoni, R.V., Takayanagui, O.M., Aquino, V.H., Figueiredo, L.T., **2007**. Viral infections of the central nervous system in Brazil. *J Infect* 54**,** 589-596.

Minagawa, T., Sakuma, T., Kuwajima, S., Yamamoto, T.K., Iida, H., **1976**. Characterization of measles viruses in establishment of persistent infections in human lymphoid cell line. *J Gen Virol* 33**,** 361-379.

Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Chambon, M., Charbonne, F., Peigue-Lafeuille, H., Bailly, J.L., **2008**. Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 46**,** 87-96.

Moayeri, M., Robinson, T.M., Leppla, S.H., Karginov, V.A., **2008**. In vivo efficacy of beta-cyclodextrin derivatives against anthrax lethal toxin. *Antimicrob Agents Chemother* 52**,** 2239-2241.

Moeller, K., Duffy, I., Duprex, P., Rima, B., Beschorner, R., Fauser, S., Meyermann, R., Niewiesk, S., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J., **2001**. Recombinant measles viruses expressing altered hemagglutinin (H) genes: functional separation of mutations determining H antibody escape from neurovirulence. *J Virol* 75**,** 7612-7620.

Monnaert, V., Betbeder, D., Fenart, L., Bricout, H., Lenfant, A.M., Landry, C., Cecchelli, R., Monflier, E., Tilloy, S., **2004a**. Effects of gamma- and hydroxypropyl-gamma-cyclodextrins on the transport of doxorubicin across an in vitro model of blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 311**,** 1115-1120.

Monnaert, V., Tilloy, S., Bricout, H., Fenart, L., Cecchelli, R., Monflier, E., **2004b**. Behavior of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 310**,** 745-751.

Mooradian, A.D., Haas, M.J., Batejko, O., Hovsepyan, M., Feman, S.S., **2005**. Statins ameliorate endothelial barrier permeability changes in the cerebral tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 54**,** 2977-2982.

Muller, C.P., Kremer, J.R., Best, J.M., Dourado, I., Triki, H., Reef, S., **2007**. Reducing global disease burden of measles and rubella: report of the WHO Steering Committee on research related to measles and rubella vaccines and vaccination, 2005. *Vaccine* 25**,** 1-9.

Mungall, B.A., Middleton, D., Crameri, G., Bingham, J., Halpin, K., Russell, G., Green, D., McEachern, J., Pritchard, L.I., Eaton, B.T., Wang, L.F., Bossart, K.N., Broder, C.C., **2006**. Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J Virol* 80**,** 12293-12302.

Munro, I.C., Newberne, P.M., Young, V.R., Bar, A., **2004**. Safety assessment of gamma-cyclodextrin. *Regul Toxicol Pharmacol* 39 Suppl 1**,** S3-13.

Murakami, Y., Seya, T., Kurita, M., Fukui, A., Ueda, S., Nagasawa, S., **1998**. Molecular cloning of membrane cofactor protein (MCP; CD46) on B95a cell, an Epstein-Barr virus-transformed marmoset B cell line: B95a-MCP is susceptible to infection by the CAM, but not the Nagahata strain of the measles virus. *Biochem J* 330 (Pt 3)**,** 1351-1359.

Murphy, F.A., Nathanson, N. (**1997**) An atlas of viral pathogenesis. In: *Viral pathogenesis* (ed. by N. Nathanson), Vol. 1, pp. 433-463. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Naesens, L., Bonnafous, P., Agut, H., De Clercq, E., **2006**. Antiviral activity of diverse classes of broad-acting agents and natural compounds in HHV-6-infected lymphoblasts. *J Clin Virol* 37 Suppl 1**,** S69-75.

Naesens, L., Lenaerts, L., Andrei, G., Snoeck, R., Van Beers, D., Holy, A., Balzarini, J., De Clercq, E., **2005**. Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob Agents Chemother* 49**,** 1010-1016.

Nagata, L.P., Hu, W.G., Masri, S.A., Rayner, G.A., Schmaltz, F.L., Das, D., Wu, J., Long, M.C., Chan, C., Proll, D., Jager, S., Jebailey, L., Suresh, M.R., Wong, J.P., **2005**. Efficacy of DNA vaccination against western equine encephalitis virus infection. *Vaccine* 23**,** 2280-2283.

Natah, S.S., Mouihate, A., Pittman, Q.J., Sharkey, K.A., **2005**. Disruption of the blood-brain barrier during TNBS colitis. *Neurogastroenterol Motil* 17**,** 433-446.

Neighbour, P.A., Rager-Zisman, B., Bloom, B.R., **1978**. Susceptibility of mice to acute and persistent measles infection. *Infect. Immun.* 21**,** 764-770.

Nicolazzi, C., Abdou, S., Collomb, J., Marsura, A., Finance, C., **2001**. Effect of the complexation with cyclodextrins on the in vitro antiviral activity of ganciclovir against human cytomegalovirus. *Bioorg Med Chem* 9**,** 275-282.

Nicolazzi, C., Venard, V., Le Faou, A., Finance, C., **2002**. In vitro antiviral efficacy of the ganciclovir complexed with beta-cyclodextrin on human cytomegalovirus clinical strains. *Antiviral Res* 54**,** 121-127.

Niewiesk, S., Brinckmann, U., Bankamp, B., Sirak, S., Liebert, U.G., ter Meulen, V., **1993**. Susceptibility to measles virus-induced encephalitis in mice correlates with impaired antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 67**,** 75-81.

Nonaka, N., Farr, S.A., Kageyama, H., Shioda, S., Banks, W.A., **2008**. Delivery of galanin-like peptide to the brain: targeting with intranasal delivery and cyclodextrins. *J Pharmacol Exp Ther* 325**,** 513-519.

Norrby, E., Sheshberadaran, H., McCullough, K.C., Carpenter, W.C., Orvell, C., **1985**. Is rinderpest virus the archevirus of the Morbillivirus genus? *Intervirology* 23**,** 228-232.

Numanoglu, U., Sen, T., Tarimci, N., Kartal, M., Koo, O.M., Onyuksel, H., **2007**. Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: linalool and benzyl acetate. *AAPS PharmSciTech* 8**,** E85.

Oldendorf, W.H., **1970**. Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Res* 24**,** 372-376.

Olsson, Y., Svensjo, E., Arfors, K.E., Hultstrom, D., **1975**. Fluorescein labelled dextrans as tracers for vascular permeability studies in the nervous system. *Acta Neuropathol* 33**,** 45-50.

Pardridge, W.M., **2007**. Drug targeting to the brain. *Pharm Res* 24**,** 1733-1744.

Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., Kanmogne, G.D., **2006**. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 1**,** 223-236.

Poggio, G.P., Rodriguez, C., Cisterna, D., Freire, M.C., Cello, J., **2000**. Nested PCR for rapid detection of mumps virus in cerebrospinal fluid from patients with neurological diseases. *J Clin Microbiol* 38**,** 274-278.

Preskorn, S.H., **2005**. Pharmacokinetics and therapeutics of acute intramuscular ziprasidone. *Clin Pharmacokinet* 44**,** 1117-1133.

Preston, J.E., al-Sarraf, H., Segal, M.B., **1995**. Permeability of the developing blood-brain barrier to 14C-mannitol using the rat in situ brain perfusion technique. *Brain Res Dev Brain Res* 87**,** 69-76.

Preston, S.L., Drusano, G.L., Glue, P., Nash, J., Gupta, S.K., McNamara, P., **1999**. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ribavirin in healthy volunteers as determined by stable-isotope methodology. *Antimicrob Agents Chemother* 43**,** 2451-2456.

Rafailidis, P.I., Mourtzoukou, E.G., Varbobitis, I.C., Falagas, M.E., **2008**. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virol J* 5**,** 47.

Rajewski, R.A., Stella, V.J., **1996**. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J Pharm Sci* 85**,** 1142-1169.

Redzic, Z.B., Markovic, I.D., Jovanovic, S.S., Gasic, J.M., Mitrovic, D.M., Zlokovics, B.V., Rakic, L.M., **1996**. Kinetics and sodium independence of [3H]-tiazofurin blood to brain transport in the guinea pig. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 18**,** 413-418.

Redzic, Z.B., Markovic, I.D., Jovanovic, S.S., Mitrovic, D.M., Zlokovic, B.V., Rakic, L.M., **1995**. Slow penetration of [3H] tiazofurin into guinea pig brain by a saturable mechanism. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 17**,** 407-414.

Reese, T.S., Karnovsky, M.J., **1967**. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34**,** 207-217.

Reichard, O., Andersson, J., Schvarcz, R., Weiland, O., **1991**. Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Lancet* 337**,** 1058-1061.

Robin, S., Ramful, D., Le Seach, F., Jaffar-Bandjee, M.C., Rigou, G., Alessandri, J.L., **2008**. Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. *J Child Neurol* 23**,** 1028-1035.

Romero, J.R., Newland, J.G., **2003**. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents. *Semin Pediatr Infect Dis* 14**,** 72-82.

Rozenberg, F. (**2002**) Diagnostic des infections virales neuro-méningées. In: *Virologie Médicale* (ed. by A. Mammette), pp. 641-652. Presses Universitaires deLyon, Lyon.

Russell, R.R., Donald, J.C., **1958**. The neurological complications of mumps. *Br Med J* 2**,** 27-30.

Ryan, **2001**. Two fatal cases of adenovirus-related illness in previously healthy young adults--Illinois, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 50**,** 553-555.

Schleuning, M., Buxbaum-Conradi, H., Jager, G., Kolb, H.J., **2004**. Intravenous ribavirin for eradication of respiratory syncytial virus (RSV) and adenovirus isolates from the respiratory and/or gastrointestinal tract in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Hematol J* 5**,** 135-144.

Schneider-Schaulies, J., Meulen, V., Schneider-Schaulies, S., **2003**. Measles infection of the central nervous system. *J Neurovirol* 9**,** 247-252.

Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V., **2002**. Modulation of immune functions by measles virus. *Springer Semin Immunopathol* 24**,** 127-148.

Schubert, S., Moller-Ehrlich, K., Singethan, K., Wiese, S., Duprex, W.P., Rima, B.K., Niewiesk, S., Schneider-Schaulies, J., **2006**. A mouse model of persistent brain infection with recombinant Measles virus. *J Gen Virol* 87**,** 2011-2019.

Scott, L.J., Perry, C.M., **2002**. Interferon-alpha-2b plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs* 62**,** 507-556.

Shalev-Zimels, H., Weizman, Z., Lotan, C., Gavish, D., Ackerman, Z., Morag, A., **1988**. Extent of measles hepatitis in various ages. *Hepatology* 8**,** 1138-1139.

Shiotani, K., Uehata, K., Irie, T., Hirayama, F., Uekama, K., **1994**. Characterization of the inclusion mode of beta-cyclodextrin sulfate and its effect on the chlorpromazine-induced hemolysis of rabbit erythrocytes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 42**,** 2332-2337.

Sidwell, R.W., Allen, L.B., Khare, G.P., Huffman, J.H., Witkowski, J.T., Simon, L.N., Robins, R.K., **1973**. Effect of 1-beta-D-ribofuranosyl1-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on herpes and vaccinia keratitis and encephalitis in laboratory animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3**,** 242-246.

Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Khare, G.P., Allen, L.B., Witkowski, J.T., Robins, R.K., **1972**. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177**,** 705-706.

Snell, N.J., **2004**. Ribavirin therapy for Nipah virus infection. *J Virol* 78**,** 10211.

Soares, C.N., Cabral-Castro, M., Oliveira, C., Faria, L.C., Peralta, J.M., Freitas, M.R., Puccioni-Sohler, M., **2008**. Oligosymptomatic dengue infection: a potential cause of Guillain Barre syndrome. *Arq Neuropsiquiatr* 66**,** 234-237.

Solomon, T., **2003**. Recent advances in Japanese encephalitis. *J Neurovirol* 9**,** 274-283.

Solomon, T., Mallewa, M., **2001**. Dengue and other emerging flaviviruses. *J Infect* 42**,** 104-115.

Solomon, T., Ooi, M.H., Beasley, D.W., Mallewa, M., **2003**. West Nile encephalitis. *Bmj* 326**,** 865-869.

Spiegel, R., Miron, D., Yodko, H., Lumelsky, D., Habib, A., Horovitz, Y., **2008**. Late relapse of herpes simplex virus encephalitis in a child due to reactivation of latent virus: clinicopathological report and review. *J Child Neurol* 23**,** 344-348.

Stella, V.J., Rajewski, R.A., **1997**. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res* 14**,** 556-567.

Stella, V.J., Rao, V.M., Zannou, E.A., Zia, V.V., **1999**. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv Drug Deliv Rev* 36**,** 3-16.

Stephen, E.L., Dominik, J.W., Moe, J.B., Walker, J.S., **1976**. Therapeutic effects of ribavirin given by the intraperitoneal or aerosol route against influenza virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 10**,** 549-554.

Stock, R., Harste, G., Madisch, I., Heim, A., **2006**. A rapid quantitative PCR-based assay for testing antiviral agents against human adenoviruses demonstrates type specific differences in ribavirin activity. *Antiviral Res* 72**,** 34-41.

Studahl, M., **2003**. Influenza virus and CNS manifestations. *J Clin Virol* 28**,** 225-232.

Sweetman, L.L., Ng, Y.T., Butler, I.J., Bodensteiner, J.B., **2005**. Neurologic complications associated with respiratory syncytial virus. *Pediatr Neurol* 32**,** 307-310.

Szejtli, J., Szente, L., **2005**. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur J Pharm Biopharm* 61**,** 115-125.

Takasato, Y., Rapoport, S.I., Smith, Q.R., **1984**. An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol* 247**,** H484-493.

Tavakoli, N.P., Nattanmai, S., Hull, R., Fusco, H., Dzigua, L., Wang, H., Dupuis, M., **2007**. Detection and typing of human herpesvirus 6 by molecular methods in specimens from patients diagnosed with encephalitis or meningitis. *J Clin Microbiol* 45**,** 3972-3978.

Tewes, F., Brillault, J., Couet, W., Olivier, J.C., **2008**. Formulation of rifampicin-cyclodextrin complexes for lung nebulization. *J Control Release* 129**,** 93-99.

Tilloy, S., Monnaert, V., Fenart, L., Bricout, H., Cecchelli, R., Monflier, E., **2006**. Methylated beta-cyclodextrin as P-gp modulators for deliverance of doxorubicin across an in vitro model of blood-brain barrier. *Bioorg Med Chem Lett* 16**,** 2154-2157.

Tunkel, A.R., Scheld, W.M. (**2000**) Acute meningitis. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* (ed. by G.L. Mandell, J.E. Bennett & R. Dolin), Vol. 1, pp. 959-997. Churchill livingstone.

Uekama, K., Otagiri, M., **1987**. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3**,** 1-40.

Uhlmann, V., Martin, C.M., Sheils, O., Pilkington, L., Silva, I., Killalea, A., Murch, S.B., Walker-Smith, J., Thomson, M., Wakefield, A.J., O'Leary, J.J., **2002**. Potential viral pathogenic mechanism for new variant inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 55**,** 84-90.

Verheyden, J.P., **1988**. Evolution of therapy for cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 3**,** S477-489.

von Messling, V., Svitek, N., Cattaneo, R., **2006**. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol* 80**,** 6084-6092.

Wasay, M., Channa, R., Jumani, M., Shabbir, G., Azeemuddin, M., Zafar, A., **2008**. Encephalitis and myelitis associated with dengue viral infection clinical and neuroimaging features. *Clin Neurol Neurosurg* 110**,** 635-640.

Wasay, M., Diaz-Arrastia, R., Suss, R.A., Kojan, S., Haq, A., Burns, D., Van Ness, P., **2000**. St Louis encephalitis: a review of 11 cases in a 1995 Dallas, Tex, epidemic. *Arch Neurol* 57**,** 114-118.

Watson, J., **2002**. Prospects for hepatitis C virus therapeutics: levovirin and viramidine as improved derivatives of ribavirin. *Curr Opin Investig Drugs* 3**,** 680-683.

Weingartl, H., Czub, S., Copps, J., Berhane, Y., Middleton, D., Marszal, P., Gren, J., Smith, G., Ganske, S., Manning, L., Czub, M., **2005**. Invasion of the central nervous system in a porcine host by nipah virus. *J Virol* 79**,** 7528-7534.

Wild, T.F., **2008**. Henipaviruses: A new family of emerging Paramyxoviruses. *Pathol Biol (Paris)*.

Williamson, M.M., Hooper, P.T., Selleck, P.W., Westbury, H.A., Slocombe, R.F., **2001**. A guinea-pig model of Hendra virus encephalitis. *J Comp Pathol* 124**,** 273-279.

Willson, D.F., Landrigan, C.P., Horn, S.D., Smout, R.J., **2003**. Complications in infants hospitalized for bronchiolitis or respiratory syncytial virus pneumonia. *J Pediatr* 143**,** S142-149.

Wong, K.T., Grosjean, I., Brisson, C., Blanquier, B., Fevre-Montange, M., Bernard, A., Loth, P., Georges-Courbot, M.C., Chevallier, M., Akaoka, H., Marianneau, P., Lam, S.K., Wild, T.F., Deubel, V., **2003**. A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. *Am J Pathol* 163**,** 2127-2137.

Wright, P.J., Crameri, G., Eaton, B.T., **2005**. RNA synthesis during infection by Hendra virus: an examination by quantitative real-time PCR of RNA accumulation, the effect of ribavirin and the attenuation of transcription. *Arch Virol* 150**,** 521-532.

Wu, C., Qi, H., Chen, W., Huang, C., Su, C., Li, W., Hou, S., **2007**. Preparation and evaluation of a Carbopol/HPMC-based in situ gelling ophthalmic system for puerarin. *Yakugaku Zasshi* 127**,** 183-191.

Wu, J.Z., Larson, G., Hong, Z., **2004**. Dual-action mechanism of viramidine functioning as a prodrug and as a catabolic inhibitor for ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 48**,** 4006-4008.

Wyde, P.R., Moore-Poveda, D.K., De Clercq, E., Neyts, J., Matsuda, A., Minakawa, N., Guzman, E., Gilbert, B.E., **2000**. Use of cotton rats to evaluate the efficacy of antivirals in treatment of measles virus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44**,** 1146-1152.

Wyshak, G., Detre, K., **1972**. Estimating the number of organisms in quantal assays. *Appl. Microbiol.* 23**,** 784-790.

Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S., **2006a**. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87**,** 2767-2779.

Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., **2006b**. Measles virus receptors and tropism. *Jpn J Infect Dis* 59**,** 1-5.

Yang, J., Wiley, C.J., Godwin, D.A., Felton, L.A., **2008**. Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. *Eur J Pharm Biopharm* 69**,** 605-612.

Zhang, M.-Q., Rees, D.C., **1999**. A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery. *Expert Opin. Ther. Pat.* 9**,** 1697-1717.

Zheng, Y., Zuo, Z., Chow, A.H., **2006**. Lack of effect of beta-cyclodextrin and its water-soluble derivatives on in vitro drug transport across rat intestinal epithelium. *Int J Pharm* 309**,** 123-128.

Zi, P., Yang, X., Kuang, H., Yang, Y., Yu, L., **2008**. Effect of HPbetaCD on solubility and transdermal delivery of capsaicin through rat skin. *Int J Pharm* 358**,** 151-158.

La ribavirine est un agent antiviral à large spectre efficace *in vitro* contre de nombreux virus à ARN dont certains sont responsables d'encéphalites. *In vivo* la mauvaise diffusion de cet analogue nucléosidique au niveau de la barrière hémato-encéphalique, limite son efficacité dans le traitement des encéphalites virales. Des études antérieures ont montré la capacité des cyclodextrines natives à former des complexes d'inclusion avec la ribavirine et l'amélioration de l'activité antivirale de la ribavirine *in vitro* lorsque celle-ci est complexée à l'alpha- ou la bêta-cyclodextrine. Le bénéfice de cette complexation *in vivo*, a été évalué sur un modèle murin d'encéphalite utilisant une souche neuroadaptée du virus de la rougeole (CAM/RB) inoculée par voie intracrânienne chez la souris CBA/ca âgée de 3 à 4 semaines. Le développement de l'infection a été contrôlé par détermination de la charge virale dans le cerveau des souris, à l'aide d'une RT-PCR quantitative en méthode TaqMan amplifiant le gène N du virus de la rougeole et d'une gamme étalon externe. Lorsque les souris sont traitées par voie intrapéritonéale par 40 mg/kg de ribavirine complexée à l'alpha-cyclodextrine, la morbidité et la mortalité liées à l'encéphalite rougeoleuse sont diminuées par rapport à l'administration de ribavirine libre et la charge virale diminue de façon significative dans le cerveau au jour J6. La complexation à la bêta-cyclodextrine n'apporte pas de bénéfice comparé à la ribavirine libre. Ces données suggèrent que l'alpha-cyclodextrine améliore *in vivo* le passage de la ribavirine au travers de la barrière hémato-encéphalique. La cinétique de la ribavirine dans le cerveau des souris traitées par le complexe ribavirine/alpha-cyclodextrine a été étudiée de 30 minutes à 48 heures après l'administration de doses uniques ou répétées de ribavirine libre ou complexée à différents dosages. La ribavirine a été purifiée par une technique d'extraction en phase solide et quantifiée par chromatographie liquide haute performance après élaboration d'une gamme de calibration *ex vivo*. La quantité de ribavirine retrouvée dans le cerveau est plus élevée lorsque la molécule est injectée sous forme de complexe chez la souris saine ou infectée. Ces données illustrent l'amélioration de survie observée au préalable et ce modèle d'étude a permis de mettre en évidence l'impact virologique et pharmacologique de la complexation d'une molécule antivirale à l'alpha-cyclodextrine.

Mots-clés: Ribavirine, Cyclodextrine, Rougeole, Encéphalite, Activité antivirale, Barrière hémato-encéphalique.

VIROLOGIC AND PHARMACOLOGIC INTEREST OF RIBAVIRIN/CYCLODEXTRIN COMPLEXES: EVALUATION ON EXPERIMENTAL MEASLES VIRUS ENCEPHALITIS IN MICE.

The objective of this work was to study the antiviral activity of ribavirin on measles encephalitis infection when using cyclodextrins as carriers. Ribavirin is a water-soluble synthetic nucleoside with broad spectrum antiviral properties, but it is ineffective against major viral encephalitis because of a failure to cross the blood brain barrier. The use of cyclic oligosaccharides can promote the activity of many drugs and the benefit of the association of ribavirin with alpha- or beta-cyclodextrine has already been demonstrated *in vitro*. The antiviral activity of the ribavirin/cyclodextrin complexes has been evaluated *in vivo* using an experimental model based on intracranial injection of the rodent adapted CAM/RB strain of measles virus in CBA/ca mice. Measles encephalitis development was monitored daily by viral load determination in mice brain. Intraperitoneal administration of the complex ribavirin/alpha-cyclodextrin (40 mg/kg of ribavirin) decreased the morbidity and the mortality of measles virus infected mice compared to free ribavirin treatment and the viral load in the brain is reduced at day 6 post-inoculation. At the opposite beta-cyclodextrin did not enhanced ribavirin *in vivo* antiviral activity. The role of alpha-cyclodextrin thus required to be defined and notably the hypothesis of ribavirin permeation enhancement through the blood brain barrier. Ribavirin specific extraction from brain tissue was developed, based on a solid phase extraction. It was quantified by high performance liquid chromatography at different time points after intraperitoneal injection of single or multiple doses of free ribavirin or of the complex ribavirin/alpha-cyclodextrin. Whatever the tested doses, quantity of ribavirin in the brain is significantly higher when the drug is injected as a complex with alpha-cyclodextrin, in healthy or measles virus-infected mice. So pharmacokinetic of ribavirin in brain tissue explains the advantage of the complex ribavirin/alpha-cyclodextrin over ribavirin in protecting mice from intracerebral infection with measles virus and confirms the interest of cyclodextrin complexes for human central nervous system diseases treatment.

Key Words: Ribavirin, Cyclodextrin, Measles virus, Encephalitis, Antiviral activity, Blood brain barrier.

Discipline : Stratégie ARN

Laboratoire de Bactériologie - Virologie et de Microbiologie Moléculaire, Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament, Unité mixte de recherche 7565 Nancy Université – CNRS.