



HAL
open science

Inhibition par la DHEA de l'hémolyse induite par la ribavirine

Lynda Handala

► **To cite this version:**

Lynda Handala. Inhibition par la DHEA de l'hémolyse induite par la ribavirine. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-02159134

HAL Id: dumas-02159134

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02159134v1>

Submitted on 18 Jun 2019

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

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

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

**TENANT LIEU DE MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

Soutenue publiquement le 17 septembre 2018

par

Lynda HANDALA

**INHIBITION PAR LA DHEA DE
L'HEMOLYSE INDUITE PAR LA
RIBAVIRINE**

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE, Virologie, CHU Amiens

Membres :

Madame le Docteur Cécile-Marie ALIOUAT-DENIS, Virologie, CHU Lille

Madame le Docteur Christine PANNIER, Virologie, CHU Amiens

Madame le Docteur Mailys LE GUYADER, Hématologie, CHU Amiens

Monsieur le Docteur Etienne BROCHOT, Virologie, CHU Amiens

Remerciements

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Chef du Service de Virologie du CHU d'Amiens

Doyen de l'UFR de Pharmacie

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de virologie clinique et fondamentale. Merci pour la confiance que vous m'avez tout de suite accordée, pour vos conseils avisés et nos discussions enrichissantes qui m'ont aidé à définir mon parcours. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Madame le Docteur Cécile-Marie ALIOUAT-DENIS

Maître de conférences des Universités – Faculté de Pharmacie de Lille

CIIL – Center for Infection and Immunity of Lille

Molecular & Cellular Virology team

INSERM U1019 – CNRS UMR 8204

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger cette thèse. Veuillez trouver l'expression de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Christine Pannier

Praticien Hospitalier

Service de Virologie du CHU d'Amiens

Vous avez accepté de participer au jury de cette thèse. Je vous remercie de me faire l'honneur de votre présence. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Mailys LE GUYADER

Praticien Hospitalier

Service d'Hématologie du CHU d'Amiens

Tu me fais l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je t'en remercie.

Monsieur le Docteur Etienne BROCHOT

Maître de conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Laboratoire de virologie du CHU d'Amiens

Equipe AGIR

Je te remercie pour la confiance que tu m'accordes et pour tes conseils. Ton aide me fut précieuse tout au long de mon travail qui avait d'ailleurs commencé par mon initiation au fameux test de mesure de l'hémolyse.

Aux directeurs de l'équipe AGIR, les Professeurs Sandrine CASTELAIN et Pascal SONNET

Je vous remercie de la confiance que vous m'accordez et de votre disponibilité.

À toute l'équipe du laboratoire de virologie,

François HELLE, merci pour ton aide à toute heure du jour et de la nuit, pour tes précieuses recommandations et tous ces bons moments solaires (les premières impressions sont toujours très justes).

Véronique DESCAMPS, Virginie MOREL et Carole FOURNIER

Je vous remercie chaleureusement de m'avoir patiemment transmis votre expérience. Vous avez richement contribué à mon apprentissage et je vous en serai toujours reconnaissante.

Catherine MORISET

Merci ma Cathy pour ton écoute, ton humour et ta générosité. Que ferions-nous sans notre adorable mascotte ?

Catherine FRANCOIS, François PELTIER, Abderrahmane BENGRINE

Je vous remercie pour votre écoute, votre sympathie, nos discussions intéressantes professionnelles ou non, même entre deux portes.

Toni FIORE,

Comment ai-je pu vivre dans le L2 sans ton chant divin ? Que faisons-nous alors, lorsqu'il faisait beau ?

Leila, Catarina et Elodie

Vous m'avez d'emblée accueillie parmi vous, et ce furent d'agréables moments de partage, de confidences et de rires.

Hakim,

Merci de m'avoir initiée à la cytométrie en flux, et de m'avoir toujours accueillie en « immuno », avec le sourire.

Laurence, Emma et Barbara, merci pour l'aide que vous m'avez apportée.

Merci à toute l'**équipe de virologie**, à l'**équipe AGIR**, pour les moments de convivialité et les échanges enrichissants que nous avons pu avoir.

À **Sarah**, la meilleure sœur qui soit, à **Yanis** et son humour incisif.

À **toute ma famille**, toujours prête à me venir en aide même à des milliers de kilomètres.

À **PM**, univers parfait portant sur son fronton : « *Briochem et circenses* », mon soutien indéfectible, je ne saurais jamais assez te remercier.

À **Sab**, à notre amitié née entre les murs de Châtenay, nos longues nuits de révision auront fini par porter leurs fruits.

À **Ryma**, qui a su préserver notre télépathie foétale.

À **mes ami(e)s**, qu'ils soient loin ou près et qui ont toujours su écrire le monde avec moi.

À l'**Art**, qui prévient bien des maux.

Table des matières

I. INTRODUCTION.....	9
A. La DHEA	10
1. Historique.....	10
2. Structure.....	11
3. Physiologie.....	12
4. Pharmacologie.....	21
5. Supplémentation à visée thérapeutique.....	25
B. La ribavirine.....	27
1. Historique.....	27
2. Structure, synthèse et dérivés.....	28
3. Hypothèses d'action antivirale.....	31
4. Indications.....	33
C. Anémie hémolytique induite par la ribavirine.....	35
1. Pharmacocinétique de la ribavirine.....	35
2. Le globule rouge.....	38
3. Mécanisme de l'anémie sous ribavirine.....	40
4. Incidence de l'anémie hémolytique induite par la ribavirine.....	41
5. Facteurs prédictifs de l'anémie sous ribavirine.....	42
II. OBJECTIFS.....	44
III. MATERIELS ET METHODES	45
IV. RESULTATS.....	48
V. DISCUSSION.....	56
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	59
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64

Index des figures

Figure 1 : Structure de la DHEA	p.11
Figure 2 : Structure d'un cycle stéranne	p.11
Figure 3 : Représentation des glandes surrénaliennes (Townsend <i>et al.</i> 2008).....	p.12
Figure 4 : Voies de synthèse hormonale par les différentes zones de la glande surrénale	p.13
Figure 5 : La synthèse de la DHEA à partir du cholestérol d'après Kim <i>et al.</i> , 2016	p.14
Figure 6 : Régulation de la synthèse de DHEA par l'axe hypothalamo-hypophysaire	p.15
Figure 7 : Interconversion entre la DHEA et le sulfate de DHEA	p.15
Figure 8 : Synthèse des hormones sexuelles œstrogéniques et androgéniques à partir de la DHEA	p.17
Figure 9 : Evolution des concentrations plasmatiques de DHEA en fonction du moment de la journée, chez l'homme, d'après Rosenfeld <i>et al.</i> , 1971	p.19
Figure 10 : Evolution de la concentration plasmatique de DHEA en fonction de l'âge chez les hommes, d'après Hison et Raven, 1999.....	p.20
Figure 11 : Evolution des concentrations sériques de DHEA(S) chez l'homme et la femme en fonction de l'âge (Young <i>et al.</i> , 2001	p.21
Figure 12 : Des modifications de la Showdomycine et Pyrazomycine à l'origine de la ribavirine d'après Wu <i>et al.</i> 2003.....	p.27
Figure 13 : Structure et conformation de la ribavirine	p.28
Figure 14 : Méthodes de synthèse de la ribavirine selon Witkowski et Robins, 1972.....	p.29
Figure 15 : Dérivés de la ribavirine : lévovirine et viramidine d'après Deval <i>et al.</i> , 2009	p.30
Figure 16 : Métabolisme de la viramidine, prodrogue de la ribavirine, selon Wu <i>et al.</i> , 2004	p.31
Figure 17 : Les multiples mécanismes d'action décrits pour la ribavirine, d'après Thomas <i>et al.</i> , 2012.....	p.32
Figure 18 : Les 2 voies métaboliques de la ribavirine dans les cellules eucaryotes	p.36
Figure 19 : Structure des métabolites phosphorylés de la ribavirine (Endres <i>et al.</i> , 2009)	p.37
Figure 20 : Forme des globules rouges observés en microscopie électronique, (Simeoni, 2013).....	p.38
Figure 21 : Le métabolisme érythrocytaire du glucose	p.40
Figure 22 : La ribavirine cause une déplétion sévère de l'ATP intraérythrocytaire.....	p.48
Figure 23 : La DHEA limite la diminution spontanée de l'ATP intracellulaire.....	p.49
Figure 24 : La DHEA permet d'empêcher la déplétion sévère d'ATP induite par la ribavirine	p.50
Figure 25 : La DHEA empêche le rétrécissement des globules rouges mais ne supprime pas l'échinocytose induite.....	p.51
Figure 26 : La DHEA réduit l'exposition extra-membranaire de phosphatidylsérine induite par la ribavirine	p.52
Figure 27 : La DHEA réduit l'hémolyse induite par la ribavirine.....	p.53

Figure 28 : La DHEA inhibe la G6PD en présence de ribavirine	p.54
Figure 29 : La DHEA ne change pas significativement l'effet antiviral de la ribavirine	p.55
Figure 30 : Résumé graphique (Handala <i>et al.</i> , 2017)	p.59
Tableau 1 : Facteurs modifiant le taux de DHEA-S, d'après Gard 2001	p.18
Tableau 2 : Aperçu du large spectre antiviral de la ribavirine (Jeulin <i>et al.</i> , 2009).....	p.34

Abréviations

ACTH= Adréno Cortico Trophic Hormone

ADN= Acide désoxyribonucléique

AMM= Autorisation de Mise sur le Marché

ARN =Acide ribonucléique

ATP = Adénosine Triphosphate

ANSM = Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

DHEA = Déhydroépiandrostérone

DHEA-S= Sulfate de déhydroépiandrostérone

DHEA(S) = Ensemble DHEA + DHEA-S

G6PDH= Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

GTP = Guanosine Triphosphate

HMS= Shunt de la voie des Hexoses Monophosphates = PPP

IMPDH = Inosine 5' Monophosphate Déshydrogénase

NADH = Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH = Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

PPP = Pentose Phosphate Pathway = Voie des Pentoses Phosphates = HMS

RDP = Ribavirine Diphosphate

RMP = Ribavirine Monophosphate

RTP = Ribavirine Triphosphate

I. INTRODUCTION

La ribavirine a été largement utilisée dans le traitement des infections par le virus de l'hépatite C, en association avec l'interféron (McHutchison *et al.*, 1998; Poynard *et al.*, 1998). Bien que d'autres molécules l'aient aujourd'hui supplantée dans cette indication, elle reste un antiviral indiqué, notamment contre des infections chroniques causées par le virus de l'hépatite E, virus considéré comme agent pathogène émergent (Mahrt *et al.*, 2018). Si elle est souvent efficace, en fonction de la dose administrée, le revers de la médaille existe et prend la forme d'un effet indésirable majeur : une anémie hémolytique pouvant s'avérer gênante et même sévère, entraînant une faible observance voire un arrêt du traitement, compromettant toute chance de guérison.

A l'ère de la médecine 5P (personnalisée, préventive, prédictive, participative et par les preuves), l'optimisation de traitements efficaces et la réduction de la iatrogénie en utilisant des marqueurs prédictifs cliniques ou biologiques du patient, constituent des approches intéressantes.

Aussi, notre équipe avait observé que la déhydroépiandrostérone ou DHEA endogène avait un effet protecteur contre l'hémolyse induite par la ribavirine *in vitro* (Brochot *et al.*, 2014) et *in vivo* (Bodeau *et al.*, 2017). Ayant connu un succès médiatique à partir des années 90 pour sa potentielle action anti-âge (Baulieu, 1996), la DHEA est une hormone dont les multiples effets ont intéressé de nombreux chercheurs, notamment pour améliorer la qualité de vie des patients âgés.

L'objet de ma thèse s'inscrit dans la continuité des travaux initiés par notre équipe sur l'inhibition de l'hémolyse induite par la ribavirine et a pour but de comprendre par quel(s) mécanisme(s) la DHEA, cette hormone aux effets prétendument miraculeux, peut empêcher la destruction des globules rouges provoquée par l'antiviral. La compréhension du mécanisme d'action de la DHEA pourrait nous aider à mieux encadrer, documenter et promouvoir de telles pratiques, à prolonger l'utilisation de la ribavirine et à prévenir la survenue de cette anémie hémolytique.

A. La DHEA

La déhydroépiandrostérone ou prastérone est l'hormone la plus abondante de l'organisme (Kalimi M, 2000). Synthétisée par les glandes surrénales, elle est dérivée du cholestérol et est le précurseur des androgènes et œstrogènes.

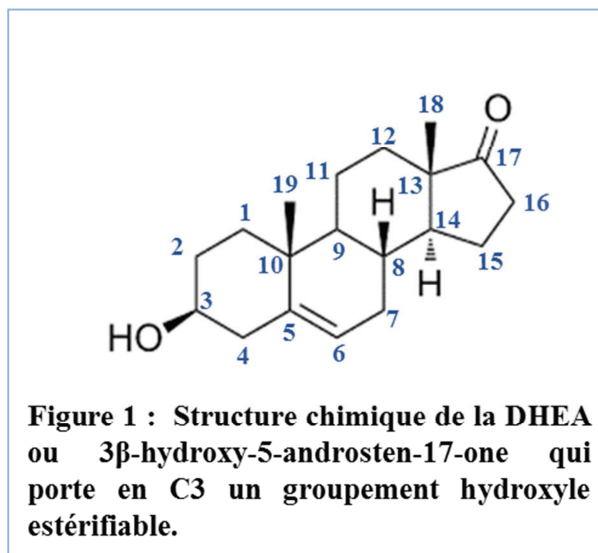
1. Historique

La DHEA fut détectée pour la première fois en 1931 (Butenandt A, 1934), dans des urines humaines, par le biochimiste allemand et prix Nobel de chimie, Adolf Buternandt. Elle sera isolée à partir du sang en 1944 par deux chercheurs américains Migeon et Plager (Migeon et Plager, 1954). En 1958, en France, le professeur Max Fernand Jayle réalise une cinétique de décroissance en dosant l'hormone chez la femme et l'homme au cours de leur vieillissement (Jayle *et al.*, 1959). Deux ans plus tard, un étudiant du professeur Jayle, le docteur Etienne-Emile Baulieu, dont le nom sera étroitement lié à la DHEA, découvre que cette dernière est synthétisée sous les deux formes (DHEA et sulfate de DHEA) par la glande surrénale.

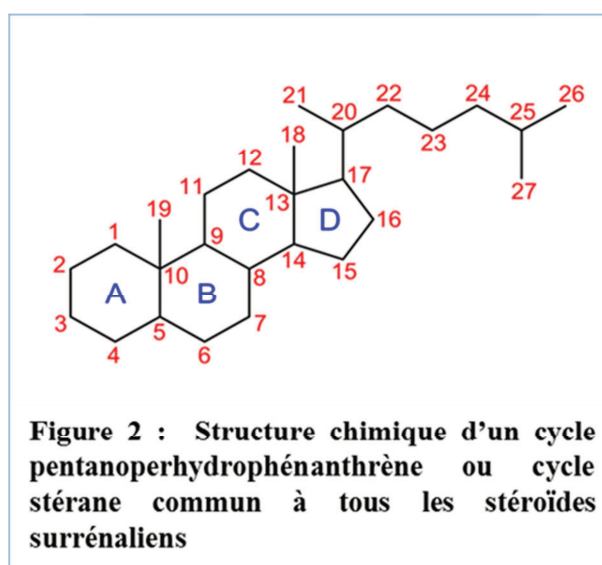
A partir des années 70, pléthore d'études commencèrent par montrer l'effet bénéfique de cette hormone sur les animaux, ainsi, Kalimi et Regelson révèlent qu'elle peut prolonger la durée de vie des animaux et protéger voire traiter certaines pathologies comme l'athérosclérose ou l'obésité (Kalimi M, 1990). C'est le professeur Yen qui, en 1994, démontrera les premiers effets antiviellissement de la DHEA chez l'Homme (Morales *et al.*, 1994), ouvrant la porte à l'espoir de l'existence d'une pilule de Jouvence. La Food Drug Administration (FDA) autorisera sa commercialisation en tant que complément alimentaire en 1995 aux Etats-Unis. Au fil des ans, la liste de ses avantages ne cesse de s'allonger : en 1996, Fernand Labrie démontre l'intérêt d'une supplémentation en DHEA dans la lutte contre l'ostéoporose compte tenu de son effet sur l'augmentation de la densité osseuse (Labrie *et al.*, 1998). Les professeurs Beaulieu et Forette publieront leur étude DHEAge en 2000, décrivant les effets positifs de l'hormone non seulement sur les os mais aussi sur la peau et la libido (Baulieu *et al.*, 2000). La DHEA est inscrite à la Pharmacopée française depuis 2003 (Pharmacopée, 2003), ce qui permet de définir des caractéristiques précises permettant son identification et fixe des valeurs seuils à respecter (pureté...) en vue d'une consommation exempte par exemple de contaminations toxiques et ainsi de mieux encadrer son usage.

2. Structure

La DHEA ou prastérone, de son nom chimique 3 β -hydroxy-5-androsten-17-one est une hormone stéroïde C19 représentée en Figure 1.



« Hormone » puisqu'il s'agit d'une substance chimique produite par une glande endocrine dans le milieu intérieur et circulant par voie sanguine afin d'agir à distance sur les récepteurs d'une cellule cible. « Stéroïde » en référence à leur nature lipidique et à leur structure chimique. En effet, elle présente une structure de base commune à tous les stéroïdes surrénaliens : le cycle pentanoperhydrophénanthrène ou cycle stérane schématisé en Figure 2 (Chung *et al.*, 1986) (Morohashi *et al.*, 1987). Elle porte en C3 un groupement hydroxyle estérifiable. Cette réaction est catalysée par une sulfuryltransférase et est à l'origine de la formation du sulfate de DHEA ou DHEA-S, que nous aborderons plus en détails ultérieurement.



La formule brute de la DHEA est $C_{19}H_{28}O_2$ et son poids moléculaire est de 288,4 g/mol. Organoleptiquement, elle se présente sous forme d'une poudre fine cristalline blanche, très soluble dans les solvants organiques comme l'éthanol (10mg/ml) ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) (15 mg/ml), très peu dans l'eau, souvent commercialisée dissoute dans du méthanol ou de l'éthanol.

3. Physiologie

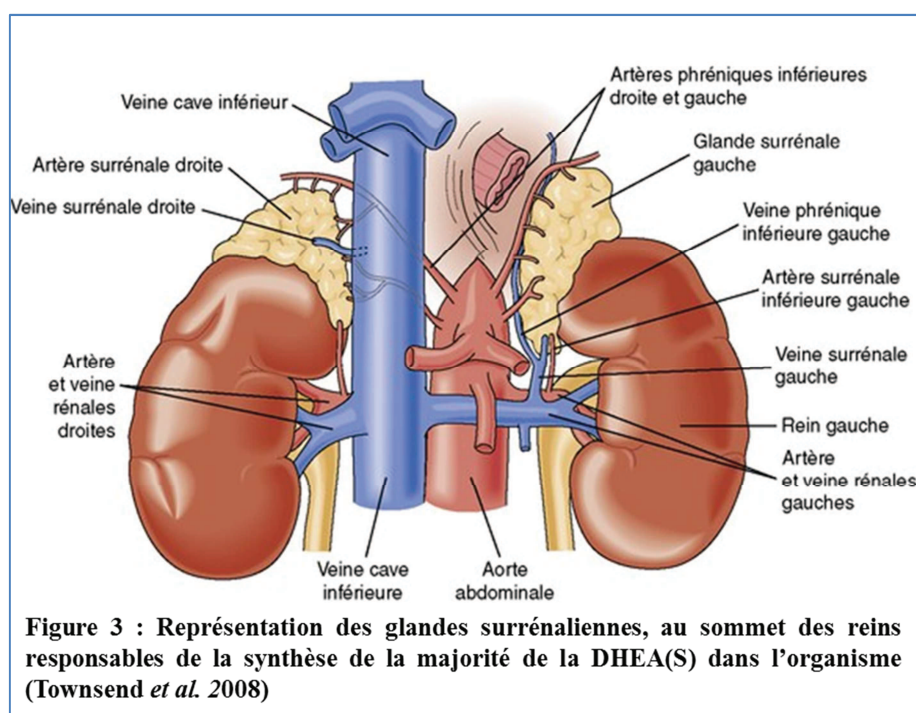
a. Biosynthèse et régulation

Lieu de synthèse

C'est en fait suite à plusieurs observations et sur la base d'un faisceau d'arguments que l'origine surrénalienne fut suspectée, en premier lieu, en 1959, par Symington *et al.* (Symington *et al.*, 1956):

- La présence de la DHEA en grande quantité dans les urines de patients souffrant de tumeur des glandes surrénales ;
- À l'inverse, sa diminution drastique chez les patients insuffisants surrénaux ;
- L'impact de l'Adrénocorticotrophique Hormone (ACTH) (suite à son administration ou à son inhibition) sur la production de DHEA, l'ACTH étant une hormone hypophysaire stimulant la formation de stéroïdes hormonaux par le cortex surrénalien.

Les glandes surrénales, au nombre de deux, sont chacune situées au sommet d'un rein (Guénard, 1996) (Figure 3).



Chaque glande est constituée d'un noyau interne et d'une couche externe la corticosurrénale (ou cortex surrénalien) divisée en trois zones et produisant :

- les glucocorticoïdes, dans la zone fasciculée,
- les minéralocorticoïdes, dans la zone glomérulée,
- les androgènes, dont la DHEA, dans la zone réticulée (Young J., 2001) (Figure 4).

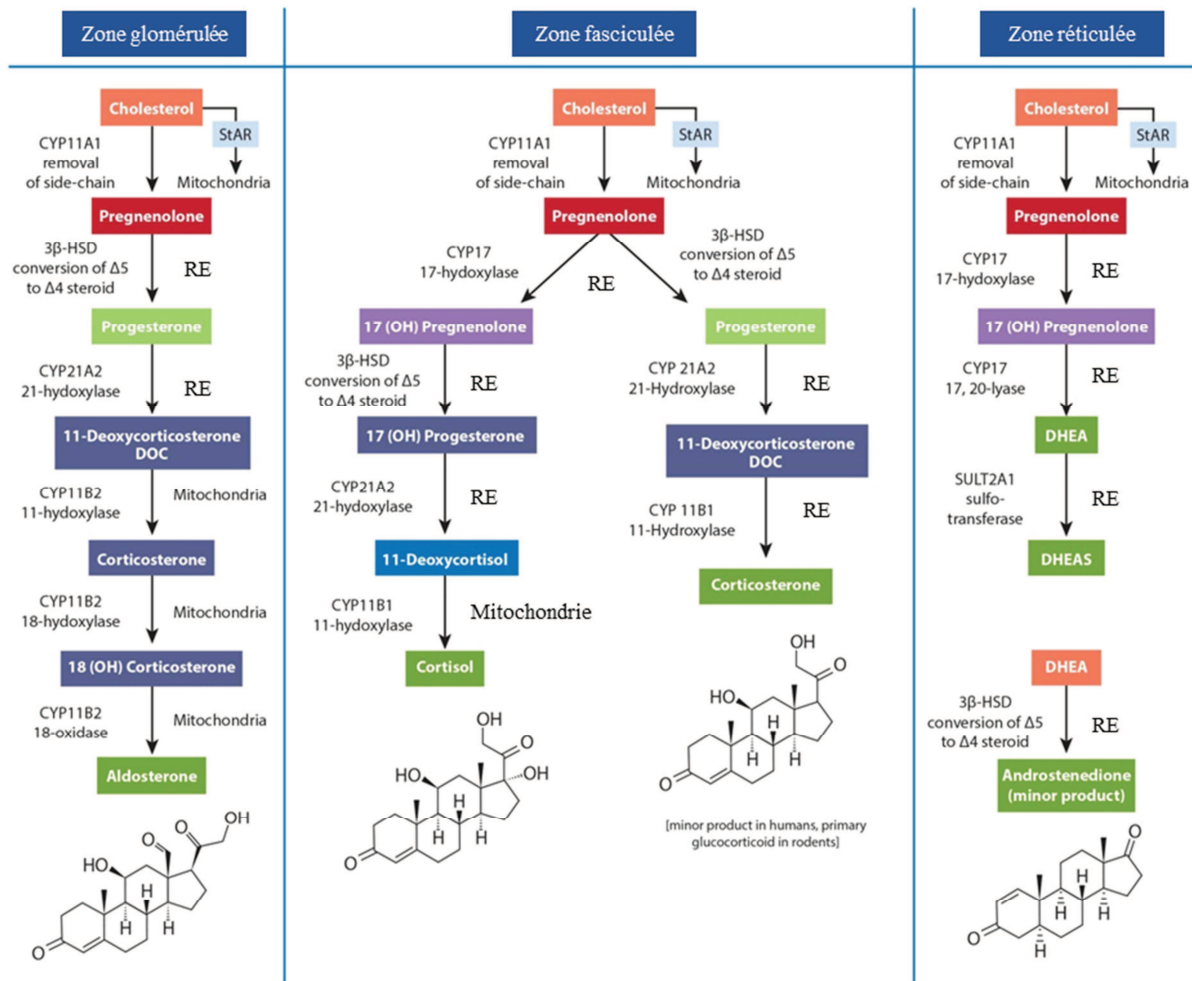


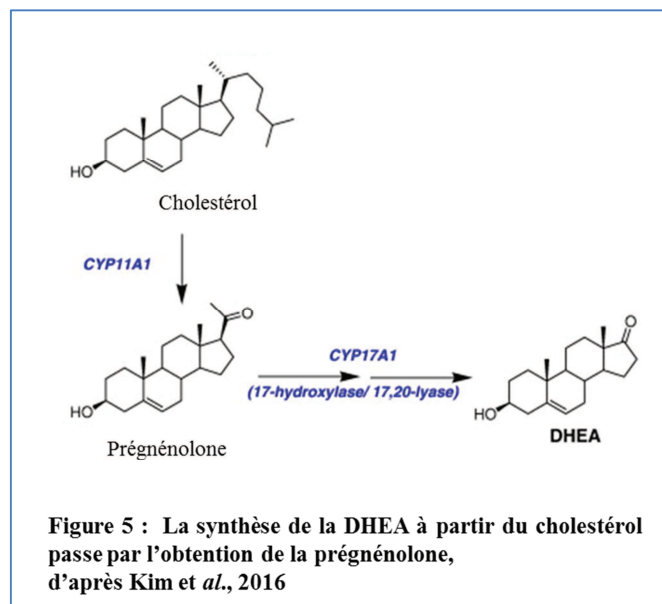
Figure 4 : Voies de synthèse hormonale par les différentes zones de la glande surrénale. La DHEA est produite par la zone réticulée comprise dans la couche externe de la glande

La DHEA est également produite en faible quantité au niveau du cerveau et du système nerveux (ce qui en fait un neurostéroïde (Baulieu, 1997)) mais aussi au niveau des ovaires et des testicules où elle joue un rôle de produit intermédiaire des hormones sexuelles (Baulieu, 1996; de Peretti et Forest, 1978). Par définition, ces stéroïdes hormonaux sont sécrétés dans la circulation sanguine où on les retrouve à de faibles concentrations (de l'ordre du ng/μl au μg/ml), la DHEA étant le stéroïde le plus abondant de l'organisme, avec une concentration 10 fois plus importante que celle du cortisol et 400

fois plus que celle de la testostérone (Herbert, 1995). Ils agissent ensuite à distance, au niveau de cellules-cibles.

Voie de synthèse

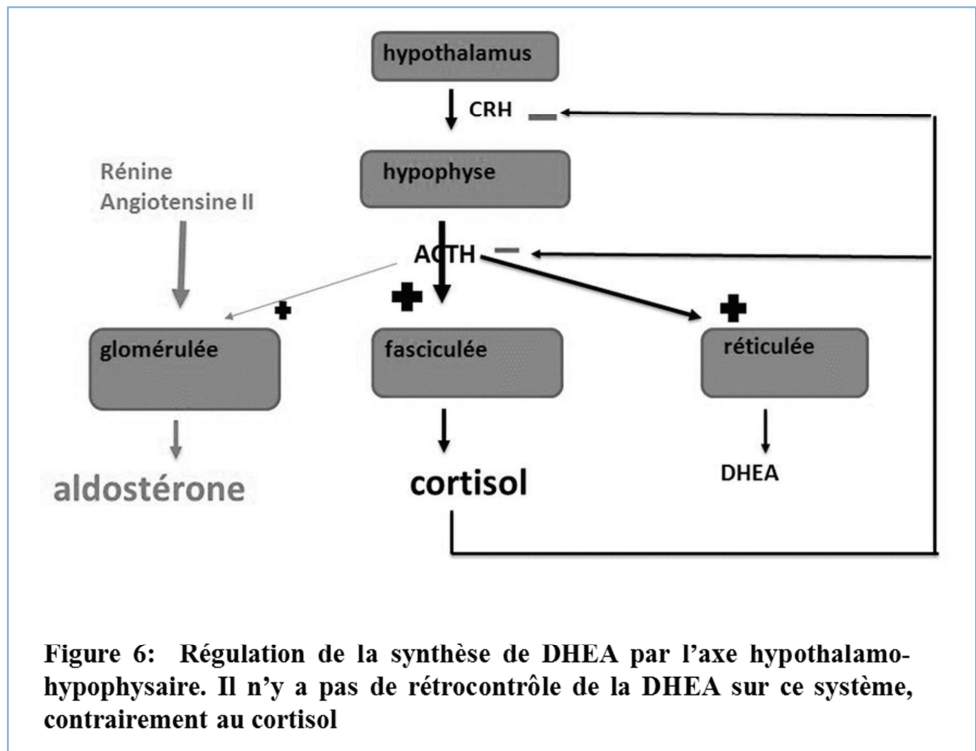
Le précurseur de la DHEA est le cholestérol qui devient prégnénolone, lui-même précurseur de toutes les hormones synthétisées dans la corticosurrénale, les ovaires et les testicules. Cette première étape est l'étape limitante de cette chaîne de réactions. La prégnénolone sous l'action de deux enzymes la 17 α -hydroxylase puis la 17-20 desmolase (ou 17-20 lyase) donnera la DHEA (Bourguignon *et al.*, 2002) (Figure 5, (Kim *et al.*, 2016)).



Au niveau du foie, du tissu adipeux et du cerveau, la DHEA, sous l'action d'aromatases pourra être convertie en oestrogènes et testostérone. C'est donc, en plus d'être une hormone elle-même, une pro-hormone. De ce fait, prégnénolone et DHEA sont considérées comme des stéroïdes intermédiaires.

Contrôle de la synthèse

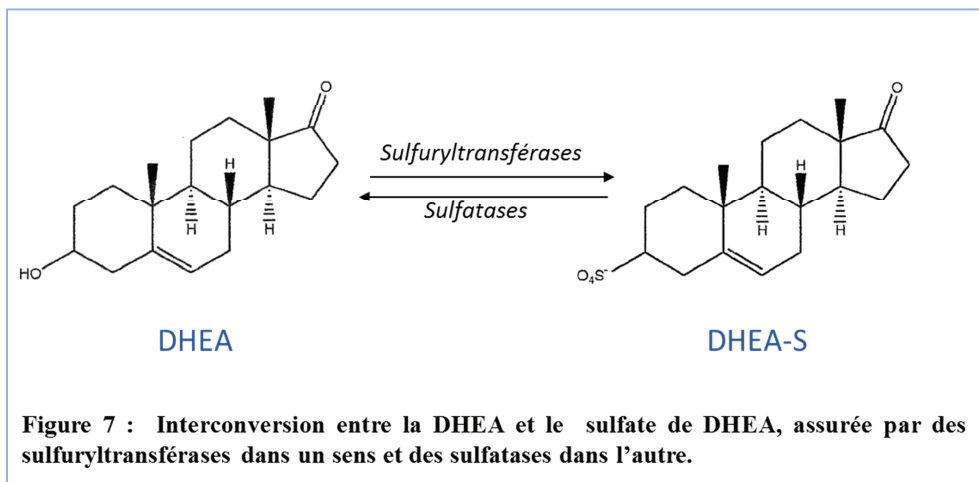
La régulation des hormones corticosurrénaliennes se fait par rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ainsi, le CRF ou Corticotrophin releasing factor libéré par l'hypothalamus stimule l'hypophyse qui produit l'ACTH ou hormone corticotrope, qui va stimuler les récepteurs du cortex surrénalien (Gard, 2001) et déclencher la synthèse des hormones à partir du cholestérol (Figure 6).



En plus d'être très sensible à l'influence de faibles quantités d'ACTH, la DHEA est aussi régulée, minoritairement, par des facteurs extrasurréaliens comme l'insulinémie (Schlienger *et al.*, 2002) ou le rythme circadien (Rosenfeld *et al.*, 1971).

b. DHEA plasmatique : DHEA et DHEA-S

La DHEA se présente sous deux formes en équilibre dans l'organisme : la DHEA et le sulfate de DHEA noté DHEA-S (Figure 7).



La DHEA-S, forme sulfoconjuguée, est la forme de stockage (Ebeling et Koivisto, 1994) mais aussi de sécrétion majoritaire (40% sécrétée par la glande surrénale), les 60% restant étant issus de la conversion périphérique de la DHEA (dont 40% d'origine surrénalienne). Cette conversion est assurée par des sulfuryltransférases principalement hépatiques et intestinales (Comer et Falany, 1992). Il s'agit là d'une des raisons pour laquelle il fut si difficile d'isoler la DHEA. Il était alors non concevable qu'une glande endocrine sécrète un sulfate. C'est pourquoi il fallut attendre l'usage de la chromatographie directe des stéroïdes conjugués sans hydrolyse, pour y parvenir. Les solvants usuellement utilisés pour l'extraction des stéroïdes libres, hydrophobes et généralement neutres, n'étaient effectivement pas efficaces sur la DHEA-S dont les concentrations plasmatiques sont 500 à 1000 fois plus importantes que celles de DHEA (Young J., 2001). Ainsi, la concentration en DHEA-S est de l'ordre de 2000 nM alors que celle de la DHEA est de 12 nM (Lavalley *et al.*, 1996b). A l'inverse, le passage du DHEA-S vers la DHEA, considérée comme forme libre, se fait par hydrolyse médiée par des sulfatases tissulaires, ce qui permet son métabolisme et son utilisation tissulaire.

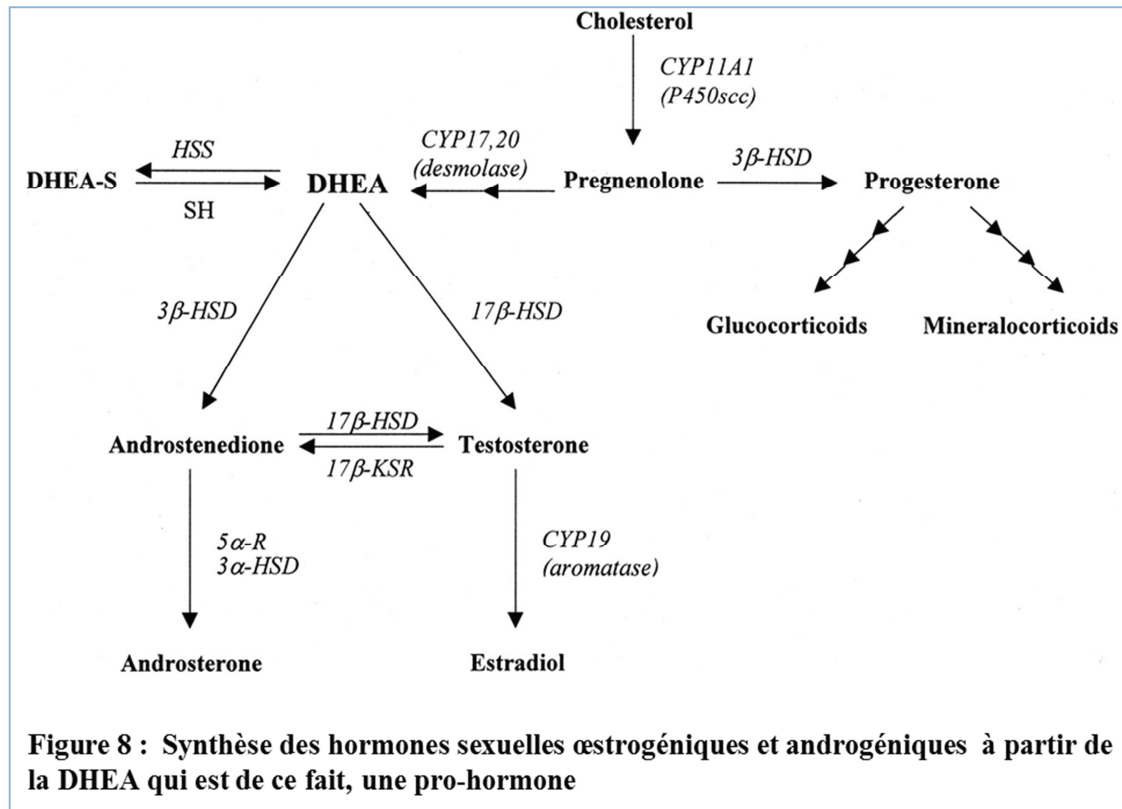
Une autre difficulté rencontrée au cours de son étude est que la plupart des modèles animaux de laboratoire sécrètent des quantités négligeables de DHEA et de DHEA-S (l'ensemble pouvant être noté DHEA(S)) (Smail *et al.*, 1982; van Weerden *et al.*, 1992), rendant difficile l'extrapolation à l'espèce humaine, qui à l'âge adulte produit des quantités importantes (25 mg/jour) de DHEA(S). Il n'est donc pas possible de réaliser d'études cinétiques et de se rendre compte, sur ces modèles, de la décroissance en DHEA(S) liée au vieillissement.

Il existe un autre réservoir de DHEA. En effet, les esters d'acide gras formés dans les tissus constituent une bonne réserve mobilisable de DHEA grâce à la LCAT (lécithine-cholestérol acyltransférase), enzyme qui peut transformer la DHEA en analogues non polaires en les liant à des lipoprotéines, la rendant plus accessible aux cellules-cibles et aux tissus périphériques (Lavalley *et al.*, 1996a).

c. Métabolisme, transport et élimination

Métabolisme

La DHEA, hormone stéroïdienne intermédiaire est aussi une prohormone, précurseur de nombreuses hormones stéroïdes sexuelles (Young *et al.*, 1997) (Figure 8)



Ce métabolisme a lieu au niveau de cellules pourvues de récepteurs androgéniques et œstrogéniques comme les tissus adipeux, les seins, la prostate, la peau, les muscles, les os, le cerveau et le foie. La testostérone peut provenir directement de la DHEA sous l'action de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD) ou de l'androstènedione issu de la transformation de la DHEA par la 3 β -HSD. Les œstrogènes sont obtenus à partir, d'une part de l'androstènedione (androstérone) et d'autre part, de la testostérone (Estradiol) (Labrie *et al.*, 1995)(Figure 8). Le rôle de certains métabolites de la DHEA comme les métabolites hydroxylés en 7 α , 13 et 16 α reste méconnu (Miller *et al.*, 2004).

Transport et élimination

La DHEA circule dans le sang liée à l'albumine (90%), ces liaisons étant faibles, elles influent peu sur son métabolisme. Elle est aussi minoritairement liée aux SHBG (pour Sex-Hormone Binding Globulin) (3-8%). Le DHEA-S, au contraire, est fortement lié à l'albumine (97-99%), influençant conséquemment son métabolisme. Par ailleurs, son groupement sulfate le protège de l'action des enzymes, ce qui explique que sa demi-vie soit plus longue que celle de la DHEA (7 à 9 heures *versus* 15 à 30 minutes) et que sa clairance soit de 1600 L/jour (*versus* 15 L/jour) (Ebeling et Koivisto, 1994).

La DHEA est éliminée sous forme glucuroconjuguée, principalement par voie urinaire (50-70% en 24h).

d. Evolution au cours de la vie et en fonction du sexe

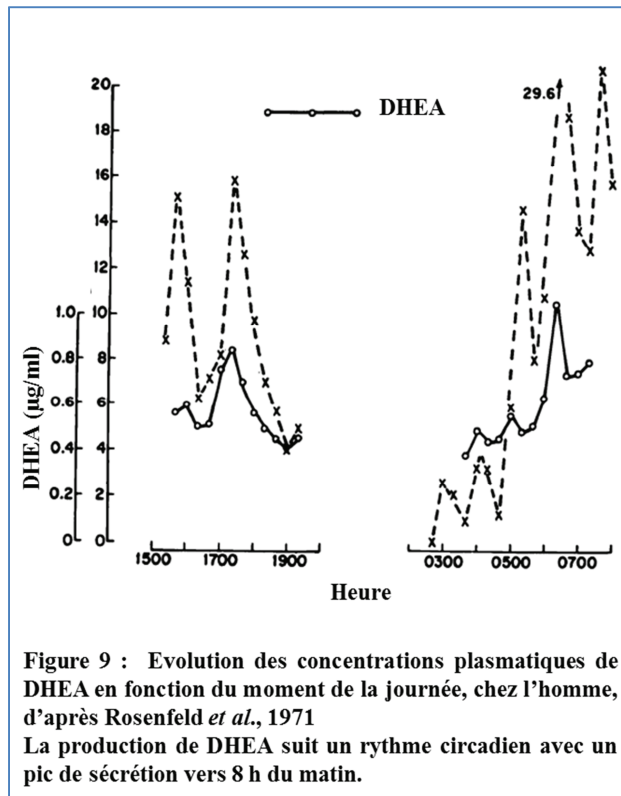
	Maladies	Médicaments	Divers
Facteurs diminuant le DHEA-S	<ul style="list-style-type: none"> - Insuffisance surrénalienne - Déficit en 17α hydroxylase - Anorexie mentale - Lupus érythémateux - Insuffisance rénale - Polyarthrite rhumatoïde - Carence en antioxydants (vitamine C et E, sélénium, magnésium) 	<ul style="list-style-type: none"> - Glucocorticoïdes - Dopamine - Insuline - Œstrogènes - Diurétiques 	
Facteurs augmentant le DHEA-S	<ul style="list-style-type: none"> - Cancers de la surrénale - Déficit en 11β hydroxylase - Déficit en 21β hydroxylase 	<ul style="list-style-type: none"> - Alprazolam - Administration aiguë d'ACTH 	Tabac

Tableau 1 : Facteurs modifiant le taux de DHEA-S, d'après Gard 2001

De nombreux facteurs influencent les concentrations plasmatiques de DHEA(S) comme l'âge, le sexe, le stress ou d'autres facteurs individuels (Guénard, 1996) (Tableau 1, (Gard, 2001)).

Variations au cours du nyctémère

La sécrétion de DHEA est sous le contrôle de la production d'ACTH et donc tributaire du rythme circadien de l'hormone hypophysaire, comme le cortisol (Rosenfeld *et al.*, 1971). Ainsi, on retrouve un pic de production à 8h du matin qui tend à décroître la journée pour remonter la nuit (Figure 9). L'avancée dans l'âge lisse cette courbe jusqu'à disparition du rythme nyctéméral. Un dosage plasmatique de la DHEA sera préférable à 8h, au moment du pic alors que la DHEA-S dont la clairance et la demi-vie sont longues, moins sujette aux variations au cours de la journée, pourra être dosée à n'importe quel moment.

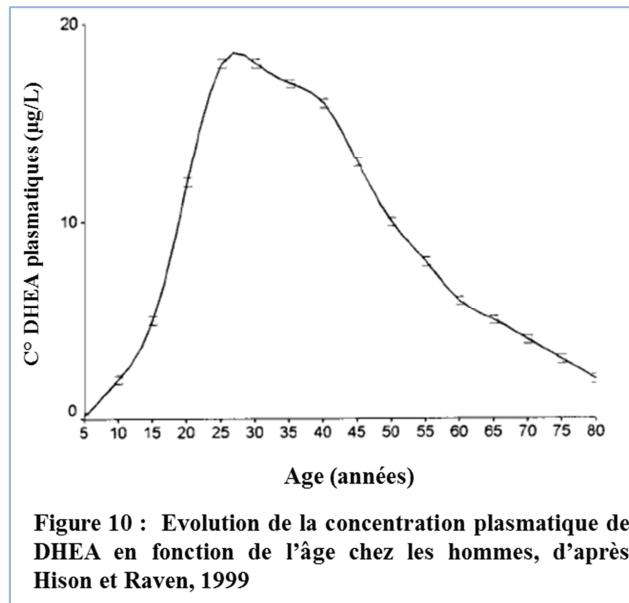


Variations saisonnières

Les taux de DHEA-S plasmatiques varient en fonction des saisons avec des concentrations optimales entre Février et Avril (Orentreich *et al.*, 1984).

Evolution en fonction de l'âge

Chez le fœtus, on observe une production en grande quantité de DHEA(S) avant la naissance. Une partie de cette production est transformée en œstrogènes au niveau du placenta, œstrogènes qui joueront un rôle essentiel avant et pendant l'accouchement. Au cours du premier mois de vie, les taux de DHEA(S) chuteront passant d'environ 1400 ng/ml à des concentrations près de 10 fois inférieures à un an (en moyenne 147 ng/ml) (de Peretti et Forest, 1978; de Peretti et Forest, 1976), ce taux sera en fait le plus bas au cours de la vie d'un Homme, le cortex surrénalien très développé durant la vie fœtale régressant après la naissance, et restera relativement bas jusque 7 ans (Schiebinger *et al.*, 1981), âge auquel, il commencera à augmenter (Forest, 1978) jusqu'à atteindre un pic à l'âge de 25-35 ans (2-6 µg/ml chez l'homme, 1,6-4,8 µg/ml chez la femme) (Orentreich *et al.*, 1984)(Figure 10).

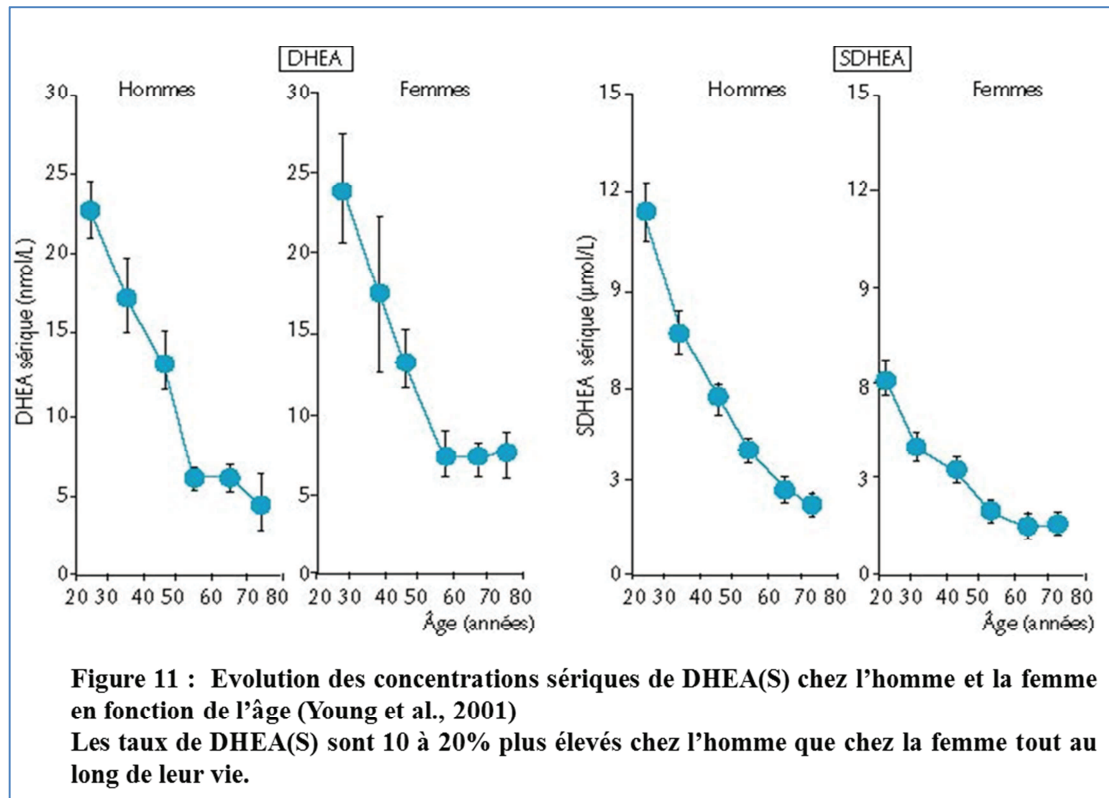


A partir de cette période, la prise d'âge sera corrélée à une diminution du taux plasmatique de DHEA et cela s'expliquerait en partie par la diminution de l'activité de la 17-20 desmolase qui assure la transformation d'un dérivé de la prégnénolone (Figure 5) en DHEA mais aussi par l'involution de la couche réticulée (Parker *et al.*, 1997). Néanmoins, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM, ex-AFSSAPS) considère qu'étant donné la grande variation interindividuelle constatée (facteur 1 à 20, selon un rapport de l'AFSSAPS de juillet 2001), cette diminution de DHEA avec l'âge n'est pas constamment observée (Orentreich *et al.*, 1992).

A partir de 60 ans, les taux sont faibles, à 90 ans, ils se réduisent à 5% de ceux observés au moment du pic (Orentreich *et al.*, 1984).

Variations en fonction du sexe

Chez l'homme les concentrations de DHEA sont 10 à 20 % plus élevées que chez la femme après le début de l'adolescence (Orentreich *et al.*, 1984) et la contribution testiculaire n'explique ce dimorphisme sexuel que partiellement. Par ailleurs, chez la femme, ces concentrations sont sujettes à variations en fonction de son état physiologique. Ainsi, chez une femme enceinte, les taux de DHEA transformés en œstrogènes deviennent plus importants. Pour les femmes ménopausées, les concentrations en DHEA décroissent, l'hormone devenant, à ce moment de leur vie, leur principale source d'œstrogènes (Labrie *et al.*, 1995). Il est à noter qu'il existe également des variations dans l'excrétion urinaire totale de DHEA-S, plus importante chez la femme (Figure 11).



Autres facteurs

Une étude au sein de 26 familles a mis en évidence une éventuelle influence de facteurs héréditaires sur les concentrations circulantes de DHEA-S (Rotter *et al.*, 1985).

Le stress et une susceptibilité accrue aux maladies sont aussi des facteurs qui auraient un impact essentiel sur la chute de la DHEA à partir de 30 ans.

Finalement, les concentrations en DHEA dans l'organisme étant très variables au sein de la population, elles devront être interprétées en prenant en compte d'autres facteurs (caractéristiques et histoire du patient, méthode de dosage...).

4. Pharmacologie

Depuis sa découverte et l'exploration de ses effets, on a prêté de nombreuses activités, particulièrement bénéfiques, à la DHEA. Mais qu'en est-il réellement ?

a. Activités pharmacologiques

Prohormone sexuelle :

Le métabolisme de la DHEA en tant que prohormone sexuelle est indéniable. Chez les hommes, l'action androgène de la DHEA libre et sa conversion en androgènes forts sont relativement

faibles avec moins de 5% de la testostérone sérique issu de cette voie (Labrie, 1991). Cette conversion en androgènes et oestrogènes prend surtout place au sein même des cellules cibles définissant ainsi l'intracrinologie (Arlt *et al.*, 1999b; Labrie, 1991) et représenterait 30 à 50 % des androgènes de l'homme (Labrie *et al.*, 2001). Chez la femme, le métabolisme périphérique de la DHEA est une source majeure d'hormones sexuelles dans la circulation avec une contribution de 40 à 75% des taux de testostérone en pré-ménopause et plus de 90% d'oestrogènes en post-ménopause (Samaras *et al.*, 2013). Une telle activité pourrait expliquer qu'au cours de l'étude DHEAge (Baulieu *et al.*, 2000), une amélioration de la libido a été observée chez les femmes de plus de 70 ans (Labrie *et al.*, 1997). Chez l'homme, une supplémentation n'apporte aucun des effets bénéfiques observés chez la femme en raison d'une persistance androgénique et œstrogénique d'origine testiculaire même au cours du vieillissement.

Neurostéroïde :

Les concentrations de DHEA mesurées au niveau cérébral sont 6,5 fois plus élevées que celles observées dans le plasma et indépendantes des productions périphériques, suggérant une production locale (Baulieu et Robel, 1996; Baulieu *et al.*, 2000; Starka *et al.*, 2015) au mécanisme non élucidé. Pour comprendre son éventuelle implication dans les processus cognitifs et dans le développement du système nerveux central, de nombreuses études ont été réalisées concluant que la DHEA est un neurostéroïde excitateur et neuromodulateur (Baulieu et Robel, 1996) qui passe bien la barrière hématoencéphalique sous sa forme libre, et que DHEA et DHEA-S ont 3 principaux mécanismes d'action à ce niveau : des effets génomiques indirects, la modulation de différents canaux et les effets des métabolites de la DHEA (Baulieu, 1999; Labrie *et al.*, 1998; Vermeulen, 1995). La production locale diffère d'une zone à l'autre dans le cerveau (Zwain et Yen, 1999) et on y retrouve plusieurs voies de métabolisation. Par exemple, dans la microglie, la DHEA est réduite par une déshydrogénase (Jellinck *et al.*, 2007) alors que dans les astrocytes la DHEA est convertie en androstenedione (Jellinck *et al.*, 2005). DHEA et DHEA-S sont des modulateurs allostériques des récepteurs GABA_A, NMDA, sigma 1 et de nombreux autres récepteurs (Hill *et al.*, 2015). Ces interactions pourraient expliquer l'effet bénéfique de la DHEA sur le bien-être et son effet positif sur la mémoire (Wolf et Kirschbaum, 1999) et antidépresseur (Hsiao, 2006; Rabkin *et al.*, 2006; Wolkowitz *et al.*, 2011). Hillen *et al.* suite à une étude sur 536 patients ont suggéré qu'un taux bas de DHEA-S pouvait être un facteur prédictif de la maladie d'Alzheimer mais il est fort probable que ces bas taux soient liés à l'état morbide des patients suivis (Hillen *et al.*, 2000).

Effets sur le métabolisme glucidique :

La DHEA aurait une action anti-gluco-corticoïde démontrée par plusieurs études *in vitro* (Blauer *et al.*, 1991; Browne *et al.*, 1992; Kalimi M, 2000) et *in vivo* chez la souris et l'Homme dont l'étude de Kroboth qui décrit une décroissance significative du cortisol après administration répétée de DHEA chez des sujets âgés (Kroboth *et al.*, 2003). Mc Nelis montrera, *in vitro* cette fois, que la DHEA inhibe l'adipogenèse dans des cellules humaines et augmente la capture de glucose (McNelis *et al.*, 2013). Une diminution de l'obésité abdominale a été observée par Villareal et Holloszy (Villareal et Holloszy, 2004), au cours d'une étude chez des sujets âgés supplémentés en DHEA (50 mg/jour) pendant 6 mois. Cette action anti-gluco-corticoïde n'est cependant pas liée à une interaction avec le récepteur aux gluco-corticoïdes (Muller *et al.*, 2004).

Effets sur le métabolisme lipidique :

Des études ont montré une diminution du cholestérol total dont le HDL-Cholestérol chez des femmes traitées par de la DHEA durant 4 mois, ce qui pourrait potentiellement augmenter les risques cardiovasculaires à long terme (Arlt *et al.*, 1999a).

Rôle sur le système osseux et la peau :

Au cours de l'étude DHEAge, une amélioration de la densité osseuse a été rapportée chez la femme de plus de 70 ans avec une augmentation de la masse osseuse à 1 an et une diminution d'un facteur ostéoclastique. Un meilleur état de la peau au sein de cette même population est rapporté avec une augmentation de son hydratation et une diminution de la pigmentation liée à l'âge (Baulieu *et al.*, 2000; Labrie *et al.*, 1997).

Action hormonale spécifique :

A ce jour, aucun récepteur spécifique de la DHEA ou de son sulfate n'a été mis en évidence. Il est vrai que Liu et Dillon auraient décrit un potentiel récepteur de la DHEA dans l'endothélium vasculaire mais cette découverte n'a pas été confirmée par d'autres travaux et mérite des investigations plus poussées (Liu et Dillon, 2002). Cela pourrait néanmoins présager d'une action spécifique directe.

Inhibition de la Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase :

La DHEA à l'instar d'autres stéroïdes, a été décrite dans plusieurs études comme un inhibiteur non compétitif de la G6PD par liaison au complexe enzyme-substrat (Gordon *et al.*, 1995; Marks et Banks, 1960). Cette inhibition entraîne une baisse du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (réduction) et de ribose phosphate (synthèse des nucléotides). Cette inhibition peut être

mise à profit afin d'obtenir un effet cytostatique et ainsi ralentir la croissance tumorale (Hamilton *et al.*, 2012).

La G6PD est une enzyme clef dans la voie des Pentoses Phosphates (PPP) ou voie de Warburg-Dickens-Horecker aussi appelée shunt des hexoses monophosphates (HMS), qui joue un rôle important au sein des érythrocytes humains dans lesquels la glycolyse est la seule source d'énergie sous forme d'ATP. Cette voie joue également un rôle dans le maintien des défenses antioxydantes par la production de NADPH, coenzyme du glutathion qui sous sa forme réduite permet de prévenir l'oxydation des lipides membranaires et de l'hème.

Effet antiviral :

La DHEA a montré un effet antiviral *in vitro* sur plusieurs virus. Torres *et al.* ont montré une action antiherpétique avec une inhibition virale de 99,99% à une concentration de 180µM (Torres *et al.*, 2012). Chang *et al.* ont mis en évidence que la DHEA pouvait réduire de façon dose-dépendante l'effet cytopathique et l'apoptose provoqués par le virus de l'encéphalite japonaise ainsi que sa propagation (Chang *et al.*, 2005). Plusieurs autres études ont démontré son activité antivirale parfois supérieure à celle de la ribavirine comme ce fut le cas sur le virus de la stomatite vésiculeuse à une concentration de 200µM, ainsi une diminution de 2 à 3 log de la charge virale était observée (Romanutti *et al.*, 2009). Certains dérivés de la DHEA ont aussi été testés comme l'Immunor 28 dont l'IC50 est de 22µM sur le virus de l'immunodéficence humaine (VIH), probablement par inhibition de la fusion intercellulaire (Diallo *et al.*, 2000).

Effets chez l'animal :

De nombreuses études ont été réalisées chez la souris et ont montré des effets bénéfiques de la DHEA sur le système immunitaire (immunomodulation des lymphocytes B, T et monocytes) avec une meilleure résistance aux infections virales et une meilleure réponse vaccinale (Loria *et al.*, 1988). Une action anti-tumorale a également été mise en évidence chez le rongeur (Gordon *et al.*, 1987). Néanmoins, le modèle murin et les rongeurs en général, ne sont pas un modèle d'étude adapté de la DHEA car ces animaux sécrètent très peu l'hormone. Par ailleurs de fortes concentrations ont pu leur être administrées entraînant la métabolisation d'une quantité conséquente d'hormones sexuelles. Une telle transposition chez l'Homme pourrait causer d'importants effets indésirables.

5. Supplémentation à visée thérapeutique

a. Mode d'administration

La DHEA est largement absorbée et convertie au niveau du foie en DHEA-S après administration par voie orale. L'administration de DHEA-S est inutile car elle est hydrolysée au niveau de l'estomac en DHEA avant de rejoindre la circulation sanguine où elle permet une augmentation de la concentration circulante. Il est préférable qu'elle ait lieu le matin au milieu du repas pour une biodisponibilité optimale.

b. Durée

Un usage prolongé doit être évité en particulier pour le risque de stimuler, par la métabolisation en hormones sexuelles, ou d'induire, des cancers hormonodépendants (prostate, endomètre utérin, sein). Des études ont été réalisées sur 6 à 12 mois, des effets sont observés au bout de 3 mois de traitement en général.

c. Dosage

Selon de nombreuses études dont l'étude DHEAge, des doses ≤ 50 mg/ jour administrées par voie orale, ont toujours été bien tolérées par les patients. A des doses de 1500 mg, des effets indésirables peu sévères ont été observés mais les hormones sexuelles dosées après ces prises ne dépassaient pas les valeurs normales présageant l'absence de symptômes androgéniques délétères. Néanmoins, au-delà de 1500 mg/jour, une insulino-résistance pourrait apparaître (Nestler, 1997) et des lésions pancréatiques chez le rat ont été observées au-delà de ces concentrations (Tagliaferro *et al.*, 1992).

Dans tous les cas, toute prescription devrait être précédée d'un bilan hormonal prenant en compte les taux de DHEA(S) mais aussi les hormones androgéniques et œstrogéniques ainsi que des échographies mammaires ou de la prostate pour éviter tout risque de stimulation d'un cancer hormonodépendant.

d. Indications

Selon le rapport du 3 juillet 2001 de l'ANSM, il n'y a pas d'intérêt à administrer un traitement systématique dans la lutte contre le vieillissement, la balance bénéfice-risque étant défavorable compte tenu du risque de développer un cancer hormono-dépendant notamment prostatique (Jones *et al.*, 1997) ou mammaire. Néanmoins, chez certains patients comme les femmes ménopausées dont le taux de DHEA(S) est particulièrement bas (Baulieu *et al.*, 2000) et dans les cas de déficits surrénaliens (Arlt *et al.*, 1999a), une supplémentation en DHEA peut être bénéfique puisque

responsable d'effets positifs indéniables sur leur bien-être, leur état de santé général (amélioration de la densité osseuse, de l'état cutané, diminution de l'atrophie vaginale...) qui pourrait s'expliquer par la compensation de l'épuisement ovarien. L'amélioration des symptômes du lupus érythémateux disséminé (avec diminution des doses de corticoïdes) sous DHEA est également une piste intéressante à explorer qui a fait l'objet de plusieurs études de van Vollenhoven mais dont la durée n'excédait pas 12 mois (van Vollenhoven, 2002; van Vollenhoven *et al.*, 1999). La DHEA fait actuellement l'objet de plusieurs essais cliniques dans le cadre de l'amélioration de la fonction ovarienne dans des projets de fécondation *in vitro* en phase 3 ou 4, dont les résultats ne sont pas encore publiés.

e. Contre-indications

Chez la femme ménopausée sous traitement substitutif hormonal, la DHEA est contre-indiquée à cause du risque de surdosage en hormones androgéniques et de ce fait d'un risque d'hyperandrogénie (acné, hirsutisme, alopecie...)

f. Ethique

La DHEA est autorisée à la commercialisation en France dans le cadre des préparations magistrales. Elle doit donc être prescrite par un médecin et délivrée par un pharmacien qui doit en garantir la qualité selon les normes dictées par la Pharmacopée française. En revanche, considérée comme un anabolisant, sa consommation est interdite dans les milieux sportifs.

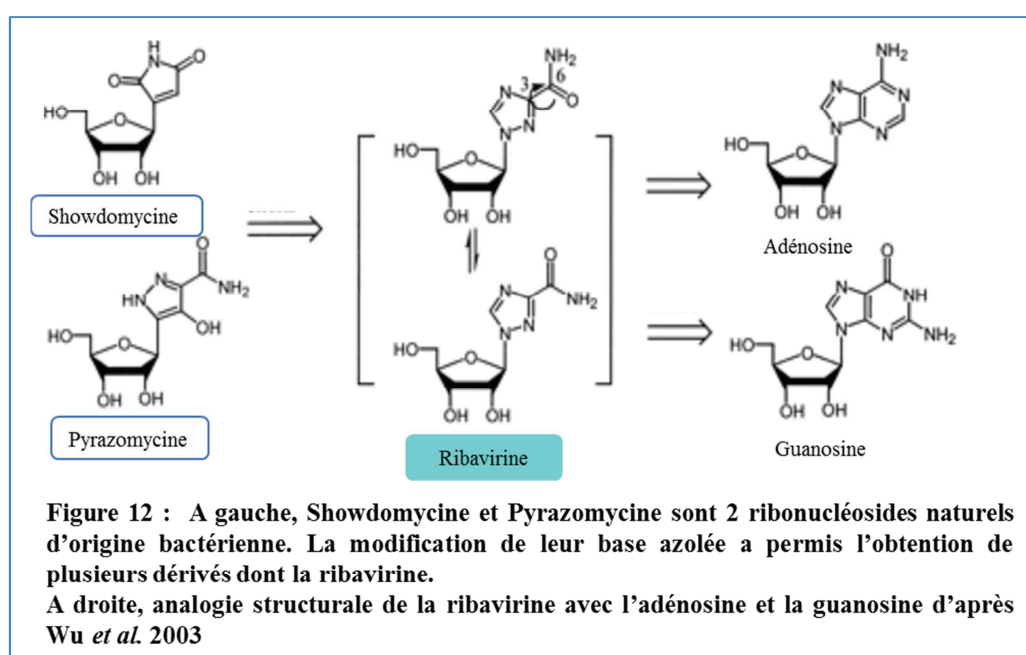
Globalement, des zones d'ombre persistent autour de la DHEA qui mériterait, pour ses effets bénéfiques et son innocuité à des doses contrôlées, qu'elle fasse l'objet d'études randomisées avec un nombre d'inclusions plus significatif et de plus longue durée. Une méta-analyse de Peixoto *et al.* souligne par ailleurs l'intérêt d'une telle supplémentation et conclut, en se basant sur l'ensemble des études réalisées avant 2017 portant sur l'amélioration de la sexualité par la DHEA, qu'une supplémentation présente une très faible prévalence d'effet indésirable majeur même sur de longues durées (Peixoto *et al.* , 2017).

B. La ribavirine

Analogue nucléosidique de synthèse, la ribavirine est un antiviral au large spectre qui a longtemps été utilisé dans le traitement des hépatites C chronique en association avec l'interféron. Son efficacité sur de nombreux virus à ARN ou à ADN en fait un candidat de premier choix dans le traitement des viroses émergentes.

1. Historique

Elle fut synthétisée pour la première fois en 1970 principalement par les docteurs J.T. Witkowski et RK Robins (Witkowski *et al.*, 1972). Initialement, ce sont deux ribonucléosides naturels produits par des bactéries, la pyrazomycine et la showdomycine qui suscitent de l'intérêt pour leur activité antivirale sur plusieurs virus. Des modifications de la base azotée commune aux deux molécules permettent l'obtention de plusieurs dérivés dont la ribavirine qui s'avérera être la molécule la plus prometteuse d'un point de vue antiviral (Figure 12). Ainsi, son activité à large spectre est reconnue dès 1972 (Sidwell *et al.*, 1972) avec une activité sur au moins 16 virus à ADN ou à ARN dont les virus Herpès simplex 1 et 2, le Coxsackievirus B1 ou d'autres virus responsables d'infections respiratoires. Cette dernière activité sera à l'origine de la commercialisation d'une forme aérosol avant d'être testée dans le début des années 90 sur le virus de l'hépatite C, qui venait d'être découvert (1989) (Choo *et al.*, 1989). Peu de temps après elle montra une activité sur le virus de l'hépatite B (Kakumu *et al.*, 1993) puis de l'hépatite E (Kamar *et al.*, 2010). D'autres activités, anti-tumorales cette fois sont aujourd'hui imputées à la ribavirine, qui ciblerait un oncogène l'eIF4E (Kentsis *et al.*, 2004), activerait l'apoptose et modulerait l'expression de plusieurs gènes.



2. Structure, synthèse et dérivés

La ribavirine, de son nom chimique 1-(β -D-ribofuranosyl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide présente une base triazolée et un groupement carbonamide (Figure 13A) qui en fait, suite à une rotation de 180° de la liaison C3-C6, un analogue structural de l'adénosine ou de la guanosine (Figure 13B).

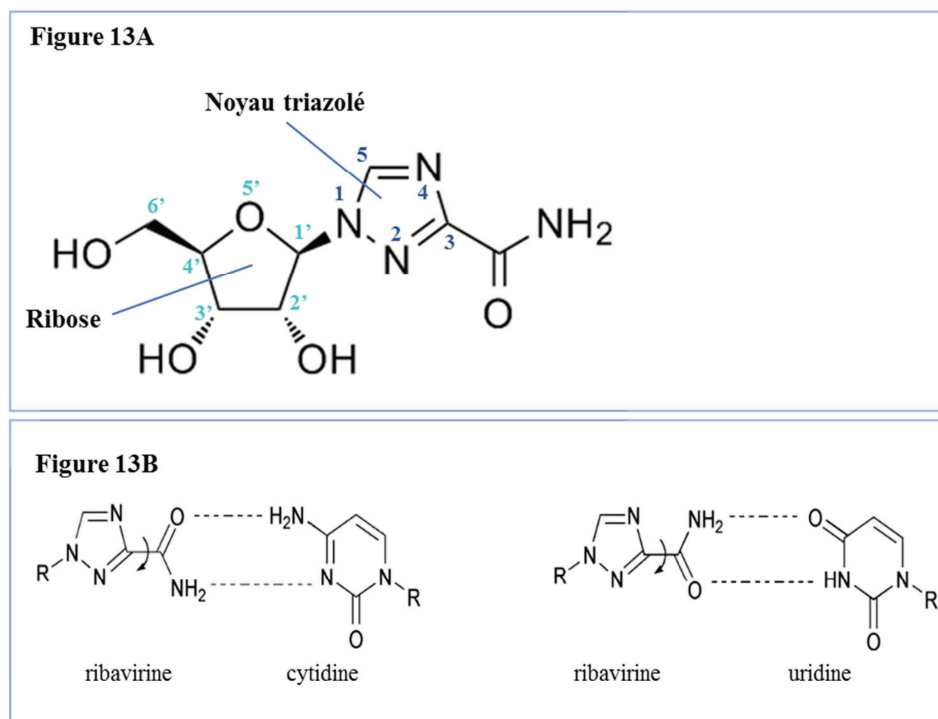


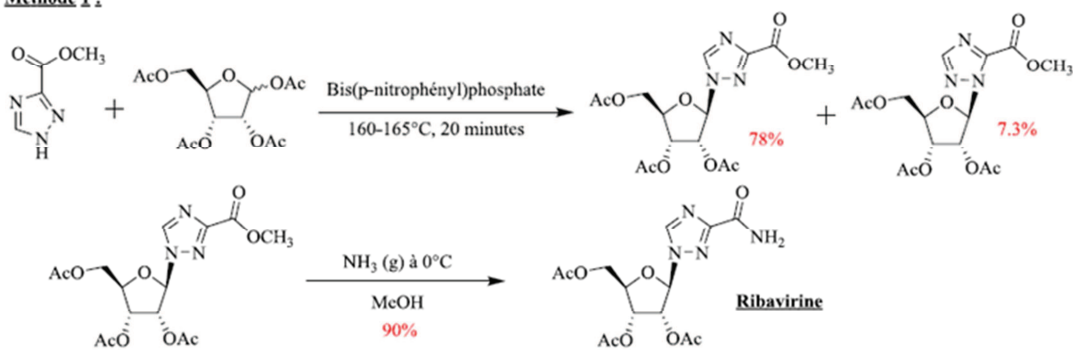
Figure 13 : Structure et conformation de la ribavirine

Figure 13A : Structure chimique de la ribavirine ou 1-(β -D-ribofuranosyl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide avec son noyau triazolé

Figure 13B : Conformation de la ribavirine : roation du groupement carboxamide et appariement, indifféremment à une cytidine ou une uridine, d'après Young *et al.* 2011

La ribavirine a été synthétisée selon deux méthodes représentées en Figure 14 qui impliquent d'abord une glycosylation puis une aminolyse.

Méthode 1 :



Méthode 2 :

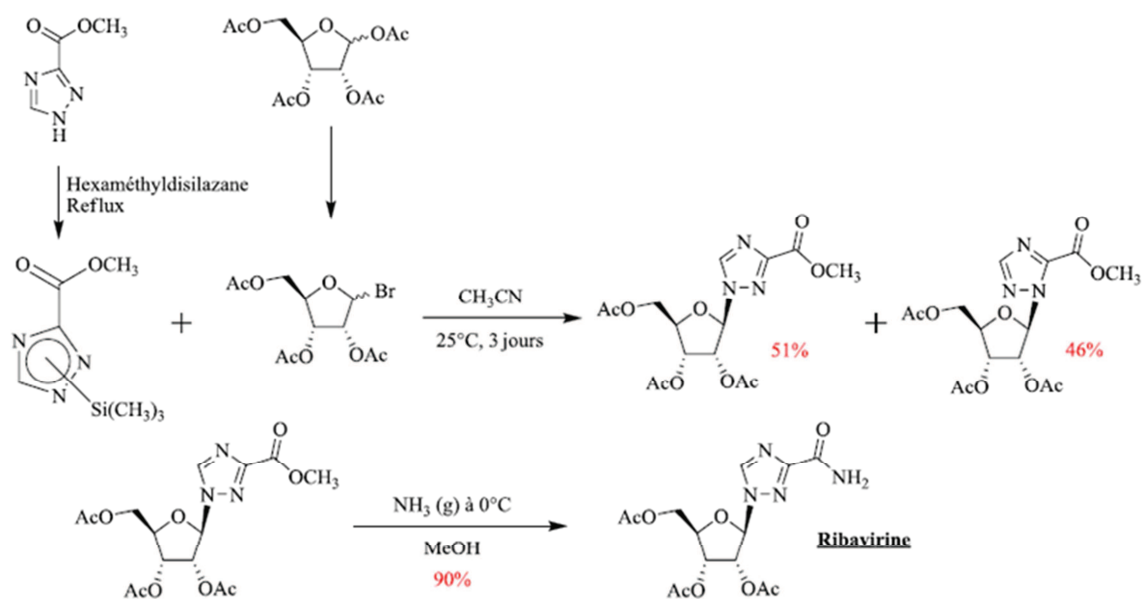
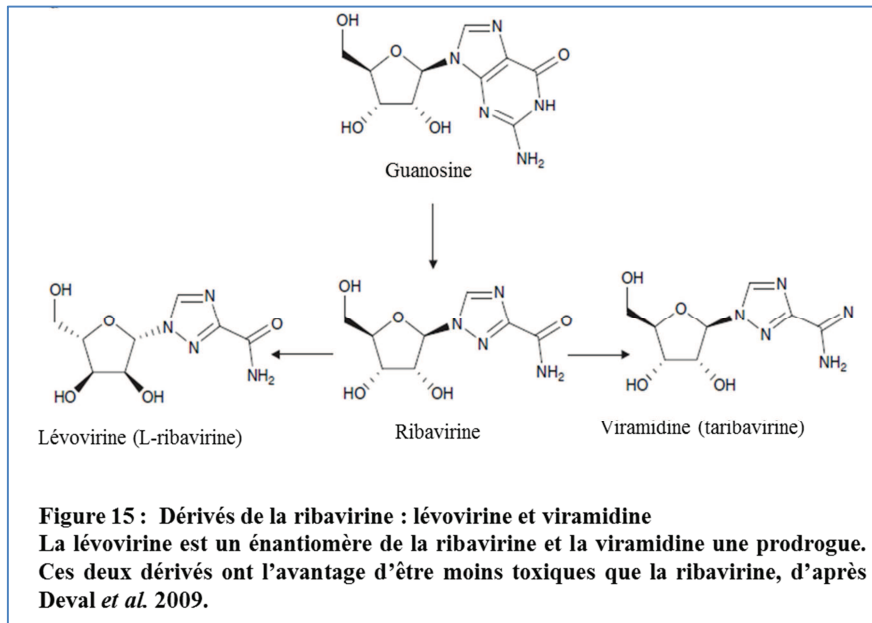


Figure 14 : Méthodes de synthèse de la ribavirine selon Witkowski et Robins, 1972.

Ces synthèses impliquent d'abord une glycosylation puis une aminolyse.

Deux dérivés de la ribavirine ont été étudiés pour leur potentielle innocuité : la lévovirine, L-énantiomère de la ribavirine ou L-ribavirine (Watson, 2002) (Figure 15 (Deval, 2009)) et la viramidine.



Conséquence de sa structure particulière, la lévovirine n'est pas phosphorylée et est excrétée inchangée dans les urines. De ce fait, elle ne s'accumule pas dans les érythrocytes, ce qui explique ses moindres effets indésirables même à des doses supérieures à 1200 mg (Tam *et al.*, 2000). Néanmoins, la lévovirine est incapable d'inhiber l'inosine 5' monophosphate déshydrogénase (IMPDH) ou les polymérase virales ce qui en fait un piètre antiviral *in vitro*. Cependant, l'activité immunomodulatrice de la ribavirine est conservée.

La viramidine ou taribavirine, un autre dérivé de la ribavirine, est différente de cette dernière du fait du remplacement du groupement carboxamide par un groupement carboximidine. Contrairement à la ribavirine, la viramidine s'accumule deux fois moins dans les érythrocytes et présente une distribution hépatique trois fois plus importante (Wu *et al.*, 2004), point intéressant dans le traitement des hépatites virales. La viramidine est en fait une prodrogue puisqu'elle est transformée en ribavirine dans les hépatocytes où elle est ensuite phosphorylée (Lin *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003) (Figure 16). Les deux molécules ont des activités antivirales *in vitro* semblables mais la viramidine a finalement fait l'objet d'essais cliniques de phase III (VISER1) qui ont confirmé qu'elle était certes 4 fois moins toxique d'un point de vue hématologique mais moins efficace en association avec l'interféron que la ribavirine dans le traitement de l'hépatite C (Benhamou *et al.*, 2009).

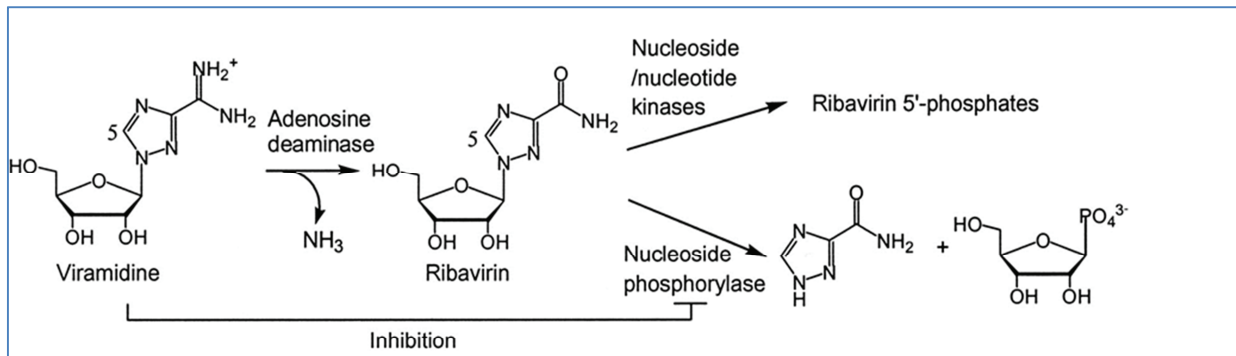


Figure 16 : Métabolisme de la viramidine (taribavirine), prodrogue de la ribavirine, selon Wu *et al.*, 2004

La viramidine est métabolisée au niveau hépatocytaire en ribavirine.

La viramidine est 4 fois moins toxique d'un point de vue hématologique que la ribavirine et possède une efficacité antivirale similaire *in vitro*.

3. Hypothèses d'action antivirale

La ribavirine est une molécule pléiotrope pour laquelle de multiples mécanismes d'action ont été proposés, qui sont non exclusifs et pourraient agir de façon synergique en fonction du type d'infection virale (Graci et Cameron, 2006; Paeshuyse *et al.*, 2011). Chaque virus semblerait présenter une sensibilité propre.

6 mécanismes d'action non exclusifs ont été décrits (Figure 17 (Thomas *et al.*, 2012)) :

- a. Immunomodulation de la réponse immunitaire de Th2 (réponse humorale) vers Th1 (réponse cellulaire) et par là, augmentation de la réponse immunitaire ;
- b. Déplétion du pool de GTP par inhibition compétitive de l'IMPDH par la ribavirine monophosphate ce qui entraîne une diminution de la production virale et une augmentation du taux de mutations par la polymérase virale. Cependant, l'existence d'une voie annexe palliant cette déplétion remet en cause ce mécanisme. Par ailleurs, l'usage *in vitro* de la lévovirine, un énantiomère de la ribavirine ayant les mêmes effets immunomodulateurs n'a montré aucune activité antivirale ;
- c. Inhibition directe de l'ARN polymérase ARN dépendante par la ribavirine triphosphate mais cela semble peu probable car la ribavirine en monothérapie dans le traitement de l'hépatite C est très peu efficace ;
- d. Inhibition directe par la ribavirine triphosphate de la synthèse de la 5'-cap ou coiffe virale *via* sa reconnaissance par la guanyltransférase ;
- e. Accumulation de mutations potentiellement létales par incorporation de la ribavirine triphosphate dans le génome menant à l'«erreur-catastrophe». Cet effet mutagène peut

avoir lieu par le biais de l'analogie de la ribavirine avec la guanosine ou l'adénosine (Crotty *et al.*, 2000). La ribavirine peut entrer en compétition avec ces deux bases et s'incorporer dans le génome néoformé des virus à ARN où elle se lie à une cytidine ou à une uridine. Ces liaisons induisent des transitions ; des changements de nucléotides de type purique vers purique ou pyrimidique vers pyrimidique. Ce mode d'action a été observé pour la première fois au cours d'une étude sur le poliovirus qui incorporait la ribavirine au sein de son ARN, ce qui avait causé une baisse de l'infectiosité d'un facteur 10 et une augmentation de la mutagenèse d'un facteur 4 (Brochot *et al.*, 2007; Crotty *et al.*, 2002; Crotty *et al.*, 2001). C'est d'ailleurs pour ce mécanisme d'action que la ribavirine a le plus souvent été utilisée sur une multitude de virus (Coxsackie, VIH, Coronavirus...) dans des études de mutagenèse ;

- f. Modulation des ISGs (Interferon Simulated Gene) et remodelage épigénétique (Brochot *et al.*, 2007; Testoni *et al.*, 2016) qui améliorent l'activité de l'interféron (traitement de l'hépatite C).

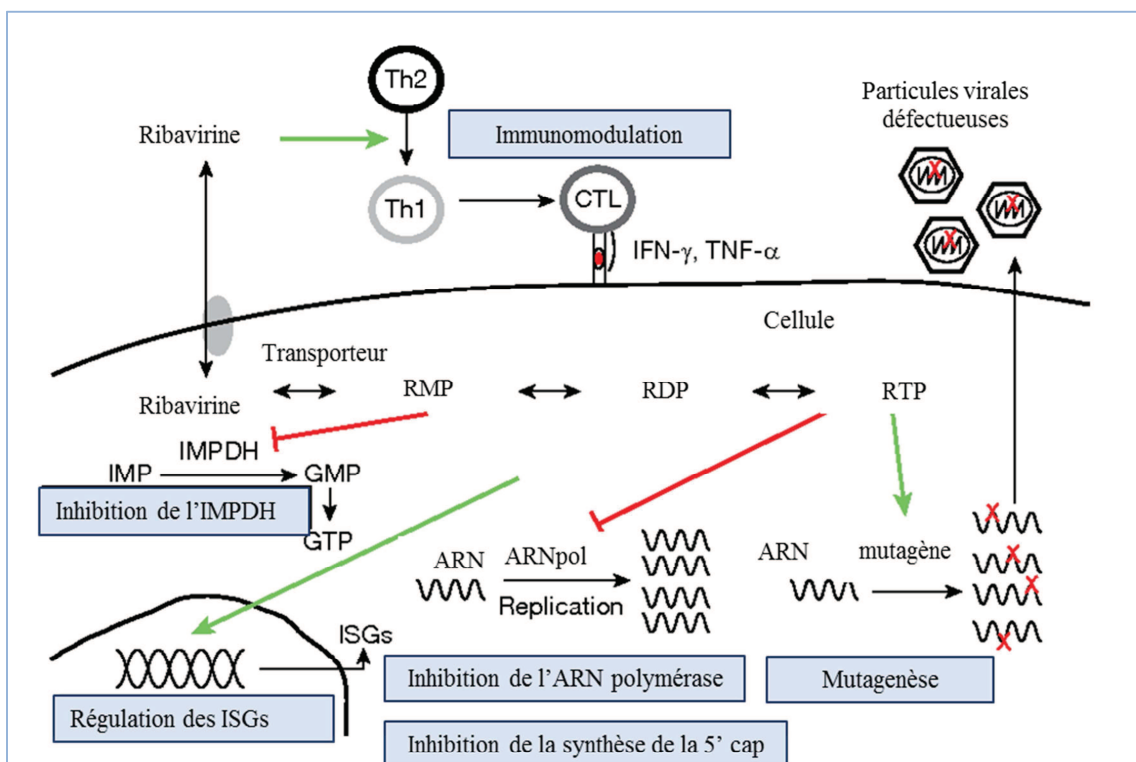


Figure 17 : Les multiples mécanismes d'action décrits pour la ribavirine, d'après Thomas *et al.*, 2012.

6 mécanismes ont été proposés et pourraient agir en synergie en fonction des virus et de leur sensibilité.

4. Indications

Le large spectre antiviral de la ribavirine fut décrit dès 1972 (Witkowski *et al.*, 1972). Officiellement, elle possède une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement de l'hépatite C chronique en association avec d'autres médicaments. Mais elle est utilisée dans le traitement de nombreuses autres infections virales comme celles dues au virus syncytial respiratoire (Beaucourt et Vignuzzi, 2014). Elle a été utilisée sous forme d'aérosol et en intraveineuse dans le cadre d'infections sévères dues au virus Influenza et chez des patients immunodéprimés infectés par le virus para-influenza ou celui de la rougeole. Elle permet également une baisse de la mortalité, en intraveineuse, dans la fièvre de Lassa ou la fièvre hémorragique due au virus Hantaan. Elle est également prescrite dans les hépatites E chroniques causées par un virus considéré comme émergent dans les pays développés (Mahrt *et al.*, 2018).

Le tableau 2 (H. Jeulin, 2009) ci-dessous donne un aperçu du large spectre d'action antiviral de la ribavirine.

Virus			Sensibilité à la ribavirine (EC ₅₀ ou dose journalière)		
Encéphalites	Flaviviridae	Encéphalite japonaise	Oui	In vitro	(134 µg/mL)
	Flaviviridae	Encéphalite à tique	NR	∅	
	Flaviviridae	Virus West Nile	Oui	In vitro	(15 µg/mL)
	Paramyxoviridae	Rougeole	Oui	In vivo	(50 mg/kg)
Fièvres hémorragiques	Arenaviridae	Fièvre de Lassa	Oui	Clinique	(NR)
	Arenaviridae	Hantavirus	Discutée	Clinique	(NR)
	Bunyaviridae	Fièvre de la vallée du Rift	Oui	In vivo	(NR)
	Bunyaviridae	Fièvre hémorragique de Crimée-Congo	Oui	Clinique	(30 mg/kg)
	Filoviridae	Fièvre hémorragique d'Argentine	Discutée	Clinique	(34 mg/kg)
	Flaviviridae	Fièvre jaune	Oui	In vivo	(40 mg/kg)
Virus émergents	Coronaviridae	SARS Coronavirus	Oui	Clinique	(1-2 g/j)
	Orthomyxoviridae	Grippe	Partielle	Clinique	(1g/j)
	Paramyxoviridae	Hendra	Oui	In vitro	(12 µg/mL)
	Paramyxoviridae	Nipah	Discutée	Clinique	(NR)
	Togaviridae	Virus de la forêt de Semliki	Oui	In vitro	(47 µg/mL)
	Togaviridae	Chikungunya	Oui	In vitro	(83 µg/ml)

Tableau 2 : Aperçu du large spectre antiviral de la ribavirine (Jeulin *et al.*, 2009)

C. Anémie hémolytique induite par la ribavirine

Malgré son intéressante action antivirale, la ribavirine est responsable de nombreux effets indésirables dont le plus sévère et le plus fréquent est une anémie hémolytique réversible (Brochot *et al.*, 2010; Feld *et al.*, 2017).

Dans une étude récente sur le traitement des hépatites E chroniques chez les patients transplantés rénaux, 54% des patients avaient eu recours à de l'érythropoïétine et 12% avaient reçu une transfusion sanguine (Kamar *et al.*, 2014).

Il est important de comprendre le mécanisme induit par la ribavirine et responsable de cette lyse des globules rouges pour pouvoir y pallier. L'état de fatigue générale généré par une telle anémie pousse de nombreux patients à interrompre leur traitement, ce qui diminue les chances de guérison.

1. Pharmacocinétique de la ribavirine

a. Absorption et distribution

Après administration par voie orale, l'absorption de la ribavirine a lieu rapidement au niveau de l'intestin grêle proximal avec un t_{\max} compris entre 1 et 2 heures (Khakoo *et al.*, 1998). Elle est assurée par des transporteurs de type concentrateurs (hCN= human contractive nucleoside transporter) (Fernandez *et al.*, 1986). La biodisponibilité absolue est de 45-65% (Lertora *et al.*, 1991), peut-être à cause d'un effet de premier passage hépatique. Il y a une relation quasiment linéaire entre dose administrée lorsque celle-ci est comprise entre 200 à 1200 mg en une fois et aire sous la courbe. Il n'y a pas de liaison protéique de la molécule aux protéines plasmatiques, de ce fait le volume de distribution est très important (4500 litres). Ceci est également dû au fait que son transport est majoritairement assuré par un transporteur de nucléosides de types es présent dans presque tous les types de cellules (Fukuchi *et al.*, 2010). Néanmoins, la majorité de la ribavirine est retrouvée dans les hématies (Jarvis *et al.*, 1998), elle y est acheminée par les transporteurs ENT1 (equilibrative transporter type 1) (Endres *et al.*, 2009) et le rapport de sa concentration sang total/plasma est de 60/1, l'excès de ribavirine dans le sang total étant sous forme de métabolites phosphorylés de la ribavirine séquestrés dans les hématies.

Homma *et al.* ont déterminé la concentration érythrocytaire moyenne en ribavirine à la semaine 4 au cours de 2 études : la première donnait une valeur moyenne de $1389 \pm 37 \mu\text{M}$ (Homma *et al.*, 2004) avec 87% de métabolites phosphorylés et la seconde de $1218 \pm 270 \mu\text{M}$ (Inoue *et al.*, 2006), ce qui est nettement supérieur aux concentrations moyennes plasmatiques mesurées au cours d'autres

études : 8,19 μM (Lindahl *et al.*, 2004) à la semaine 2 et jusque 13,1 μM à la semaine 8 (Dahari *et al.*, 2007). Lors d'une administration répétée, la ribavirine s'accumule dans le plasma avec une aire sous la courbe à 12 h 6 fois plus élevée qu'après une administration unique. L'état d'équilibre est atteint au bout de 4 semaines environ avec pour des doses de 600 mg x2 /jour, des concentrations plasmatiques proches de 2200 ng/ml. L'administration de la ribavirine au cours d'un repas riche en graisse améliore sa biodisponibilité, ainsi la C_{max} augmente de 66% si la prise est donnée au cours d'un petit déjeuner riche en graisses en comparaison à une prise à jeun (Wade *et al.*, 2006). Il existe une grande variabilité pharmacocinétique intra (<25%) et interindividuelle due à un important effet de premier passage hépatique et à un transfert à l'intérieur et à l'extérieur du compartiment sanguin.

b. Métabolisme

Nous distinguons 2 voies de métabolisation de la ribavirine dans les cellules nucléées (Figure 18).

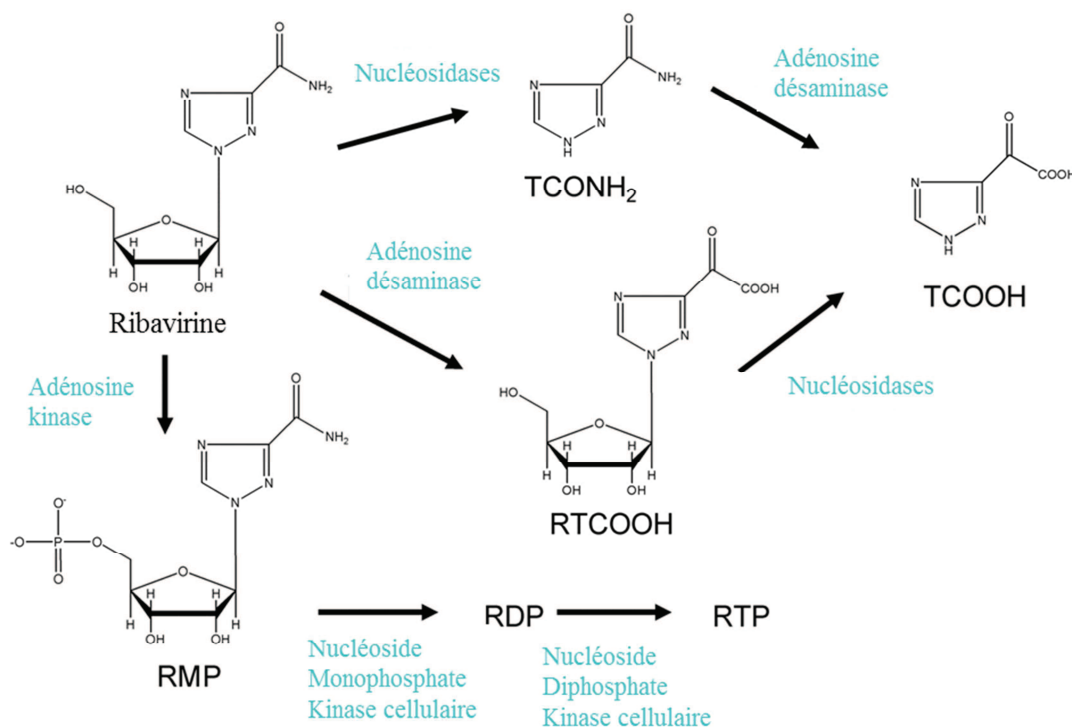
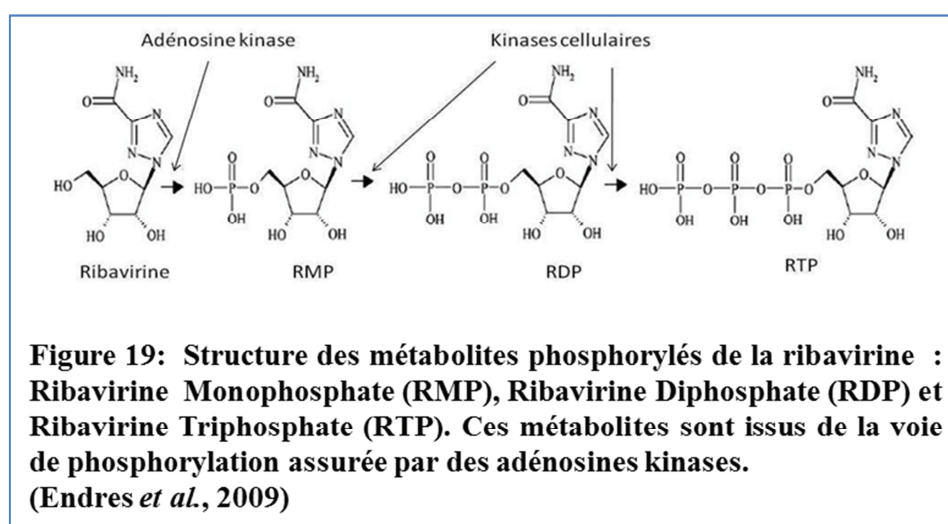


Figure 18 : Les 2 voies métaboliques de la ribavirine dans les cellules eucaryotes : une voie réversible de phosphorylation par l'adénosine kinase et une voie de dégradation qui passe par une déribosylation et une hydrolyse. Plusieurs métabolites sont ainsi produits.

D'abord une voie réversible de phosphorylation par l'adénosine kinase (Balzarini *et al.*, 1991; Willis *et al.*, 1978) en ribavirine monophosphate (RMP), ribavirine diphosphate (RDP) et ribavirine triphosphate (RTP) (Gallois-Montbrun *et al.*, 2003) (Figure 19). Dans les cellules, la RTP s'accumule à de fortes concentrations (>100 μM) après une incubation de quelques heures seulement

(Smee *et al.*, 2001). Ces niveaux de RTP sont similaires à ceux d'ATP et de GTP retrouvés dans des cellules non traitées (Jones, 1980). La RTP représente en fait 70% des métabolites intracellulaires avec un ratio de 1/5/25 pour les RMP/RDP/RTP, respectivement (Laskin *et al.*, 1987). Exception faite des érythrocytes, la RTP est rapidement dégradée (avec une demi-vie inférieure à 2 heures) lorsque la drogue est éliminée de la culture cellulaire (Page et Connor, 1990). Après la phosphorylation, a lieu une déphosphorylation lente (Glue, 1999; Khakoo *et al.*, 1998), qui explique, en partie, la longue élimination de la ribavirine. Les hématies, elles, sont dépourvues en enzymes nécessaires à la déphosphorylation des métabolites : la 5' nucléotidase et la phosphatase alcaline (Page et Connor, 1990). Ils s'y accumulent donc, une sortie passive étant également impossible car RMP, RDP et RTP sont trop polaires pour passer la membrane. Une importante quantité de RTP est finalement retrouvée dans les globules rouges atteignant un plateau au bout de 4 jours de traitement. La concentration intraérythrocytaire est alors 100 à 160 fois plus élevée que la concentration plasmatique (Inoue *et al.*, 2006).



La seconde voie est une voie de dégradation qui passe par une déribosylation assurée par des nucléosidases puis par une hydrolyse des liaisons amides par une adénosine désaminase, à l'origine de deux métabolites : les carboxyamides et carboxyacides triazolés qui sont excrétés par voie rénale (Figure 18).

c. Elimination

La demi-vie moyenne d'élimination de la ribavirine est de 140 à 160 heures pour une dose unique, contre 300 heures pour une double dose par jour. La clairance moyenne de la ribavirine varie entre 22 et 29 litres/heure après une administration unique de 600 mg de ribavirine. Cette clairance est diminuée chez des patients insuffisants rénaux avec pour les insuffisances modérées à sévères une

exposition plasmatique augmentée de 20 à 30% même avec des doses réduites en comparaison avec des doses standard administrées chez des patients à la fonction rénale normale (Cl créat. > 80ml/min) Une étude a montré qu'il était plus adapté de prendre en compte la clairance de la créatinine des patients plutôt que leur poids pour déterminer la dose à leur administrer comme préconisé par le fabricant (Bruchfeld *et al.*, 2002). La ribavirine est encore détectable dans le plasma 4 semaines après arrêt du traitement, cela étant dû au relargage de la molécule à partir des sites de séquestration intracellulaire.

2. Le globule rouge

a. Généralités

Les globules rouges sont des disques biconcaves au centre renfoncé, d'un diamètre d'environ 7 à 8 μm (Figure 20).

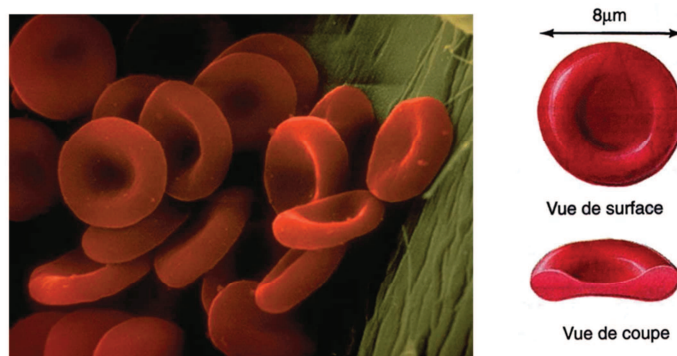


Figure 20 : Forme des globules rouges observés en microscopie électronique, (Simeoni, 2013)

Les globules rouges anucléés présentent une forme discoïde biconcave. Leur coloration rouge est dû à l'hémoglobine qu'ils contiennent et dont le rôle est d'assurer les échanges gazeux.

Sa fonction primaire est d'assurer les échanges gazeux : apporter de l'oxygène à partir des poumons vers les différents organes et tissus et débarrasser ces derniers du dioxyde de carbone. Les globules rouges restent dans la circulation sanguine au sein des réseaux veino-artériels et toute sortie de ces compartiments est anormale.

Initialement, les érythrocytes sont produits au sein de la moelle osseuse sous forme d'érythroblastes. Les érythroblastes sont nucléés et perdent leurs organites, devenant des réticulocytes, forme immature du globule rouge qui contient des reliquats d'organites (ribosomes et mitochondries). Les globules rouges matures sont constitués à 1/3 d'hémoglobine, 2/3 d'eau et contiennent des enzymes,

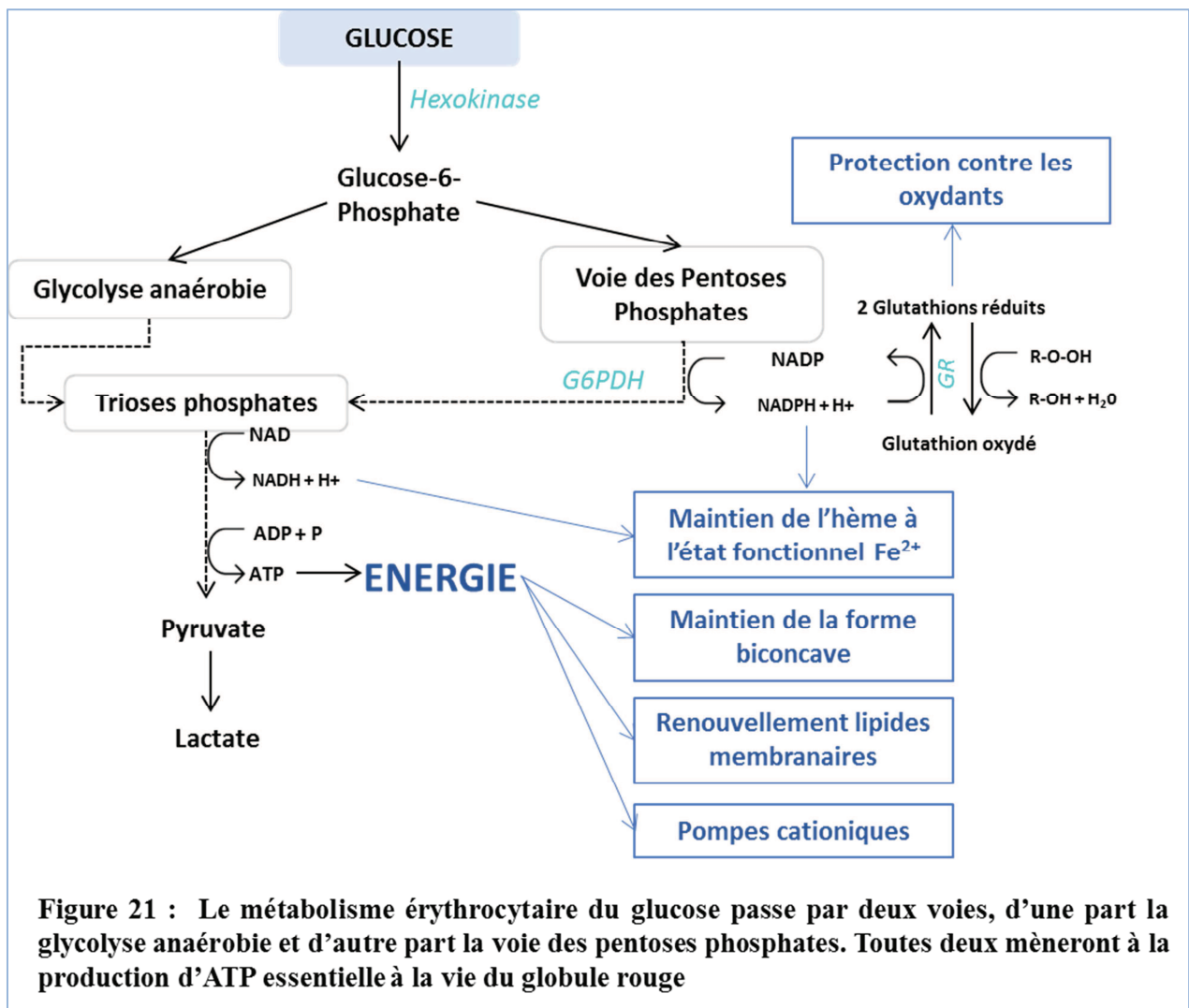
du glucose et des ions. Ils sont dépourvus d'organites et de ce fait, incapables d'assurer une nouvelle synthèse protéique. Leur métabolisme est limité mais suffisant pour mener à bien une vie de 120 jours durant lesquels leur enveloppe composée de protéines, de lipides, de glycoprotéines et de glycolipides, jouera un rôle important. Elle leur assure une certaine déformabilité (ajoutée à leur forme discoïde et à la viscosité de l'hémoglobine) qui leur permet de passer dans les capillaires du sinus des organes hématopoïétiques. Au bout de ces 120 jours, les globules rouges, vieillissant, perdent leur déformabilité et leur forme biconcave, présentent un métabolisme ralenti et des modifications biochimiques importantes. Ils sont moins fonctionnels, moins mobiles et n'assurent plus leurs fonctions. Ils doivent être éliminés et remplacés : ils sont détruits et libèrent leur hémoglobine. C'est l'hémolyse physiologique. Elle est à 90% extravasculaire et intratissulaire. Les hématies sont ensuite phagocytées par les cellules phagocytaires de la rate, du foie, de la moelle osseuse et par le système réticulo-endothélial. L'hémoglobine y est décomposée en éléments qui seront recyclés comme le fer ou dégradés comme l'hème.

b. Métabolisme énergétique des globules rouges

Le globule rouge doit produire de l'énergie (ATP ou adénosine triphosphate) pour assurer plusieurs fonctions : l'intégrité de sa membrane, la lutte contre l'oxydation, son équilibre ionique (les pompes ioniques ayant besoin d'ATP pour fonctionner) et l'état de l'hémoglobine sous sa forme réduite. L'ATP est donc essentielle au fonctionnement et à la vie du globule rouge. Sans ATP, les hématies perdent leur forme discoïde (Nakao *et al.*, 1960) et voient leur durée de vie réduite (Backman, 1986). L'ATP permet le fonctionnement des pompes ioniques (Na⁺ ATPase par exemple), de plusieurs enzymes mais aussi l'échange entre lipides plasmatiques et lipides membranaires.

Pour produire cette énergie, les globules rouges, par le biais des systèmes enzymatiques dont ils sont pourvus, dégradent du glucose (Figure 21). Ainsi, deux voies conduisent à la production d'énergie :

- La principale est la glycolyse anaérobie (90%) qui a elle-même besoin d'ATP pour fonctionner
- Puis la voie des pentoses phosphates (10%) ou shunt des hexoses monophosphates qui met en jeu deux enzymes : La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase.



Toutes deux utilisent le même substrat : le glucose-6-phosphate qui provient de la transformation du glucose par l'hexokinase. La glycolyse aérobie fournit du NADPH, coenzyme de la glutathion réductase. Elle joue donc un rôle indirect dans le métabolisme du glutathion qui doit être maintenu sous sa forme réduite en quantité suffisante dans le globule rouge afin d'éviter une oxydation de l'hémoglobine et des lipides membranaires.

3. Mécanisme de l'anémie sous ribavirine

Chez les patients sous ribavirine, l'hémolyse survient plus précocement dans la vie du globule rouge. Aussi, des chercheurs ont voulu déterminer la durée de vie des érythrocytes de patients sous traitement. Cette durée était raccourcie allant de 30 à 60 jours *versus* 85 à 129 jours chez les patients non traités (Krishnan et Dixit, 2009).

L'anémie est définie comme une baisse de l'hémoglobine sous une valeur normale : <12 g/dl chez la femme et <13 g/dl chez l'homme. Une baisse des érythrocytes non compensée est donc responsable d'une chute du taux d'hémoglobine.

Les études sur l'animal, en particulier chez le singe, ont montré que les hématies constituent la cible principale de la toxicité de la ribavirine (Canonico *et al.*, 1984), entraînant l'installation d'une anémie peu après l'initiation du traitement.

Chez l'homme, cette anémie survient également au cours des premières semaines d'utilisation. Elle est la résultante de plusieurs mécanismes dont l'initiation est l'accumulation de ribavirine triphosphate dans les érythrocytes, incapables de la déphosphoryler. La RTP entre alors en compétition avec l'ATP (Page et Connor, 1990) dont le rôle est primordial dans la vie du globule rouge. Cette diminution du taux d'ATP entrave le fonctionnement de nombreuses enzymes comme l'hexokinase responsable de la production du glucose-6-phosphate qui est au carrefour des voies métaboliques du globule rouge décrites plus haut. Cela entraîne une perturbation de la défense antioxydante par une baisse du NADH et du NADPH et par conséquent une augmentation de l'oxydation des lipides membranaires et de l'hémoglobine et une plus grande sensibilité au stress, responsables de la sénescence prématurée des globules rouges (De Franceschi *et al.*, 2000; Nomura *et al.*, 2004). Cette diminution de l'énergie entraîne aussi des modifications morphologiques, la forme discoïde et la déformabilité du globule rouge, assurées par des pompes ioniques dépendant de l'ATP, étant des paramètres essentiels à son bon fonctionnement. Les globules rouges deviennent plus sphériques, plutôt échinocytaires, perdent leur élasticité (Backman, 1986) et sont alors éliminés par le système réticuloendothélial. De plus, l'aminophospholipide translocase ATP-dépendante est également perturbée et provoque l'exposition de phosphatidylsérines à la surface extra-membranaire des globules rouges ce qui déclenche leur élimination par les phagosomes (Homma *et al.*, 2009; Kleinegris *et al.*, 2012).

L'homéostasie du globule rouge ainsi déséquilibrée conduit à leur lyse prématurée.

4. Incidence de l'anémie hémolytique induite par la ribavirine

L'anémie hémolytique induite par la ribavirine est constante et cause une perte d'environ 1g d'hémoglobine (Bodenheimer *et al.*, 1997). L'organisme tente de compenser cette diminution en produisant plus de réticulocytes (De Franceschi *et al.*, 2000). Néanmoins, la ribavirine, dans le cadre du traitement contre l'hépatite C est associée à l'interféron dont la toxicité hématologique centrale,

perturbe cette régénération, empêchant la compensation de l'anémie. Sur la base de 2 études ayant chacune inclus un nombre significatif de patients (832 et 647) (Poynard *et al.*, 1998; Sulkowski *et al.*, 2004), il a été conclu que la chute d'hémoglobine, en moyenne était de 3 g après 24 semaines de traitement, la diminution observée étant initiée une semaine après la première prise et stabilisée vers la 4^{ème} semaine. Une corrélation a pu être définie entre taux d'hémoglobine avant traitement et delta d'hémoglobine après traitement. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'hémolyse touche le pool d'hématies déjà produit. Van Vlierbergh *et al.* ont déterminé cette proportion à 17% (Van Vlierbergh *et al.*, 2001). A l'arrêt du traitement, le nombre d'hématies remonte progressivement après 3 à 10 semaines (Poynard *et al.*, 1998). Snoeck *et al.* en se référant à 2 études, ont conclu qu'il y avait plus de risques de développer une anémie lorsque les doses de ribavirine étaient augmentées avec un risque majoré à partir de 15 mg/kg (Snoeck *et al.*, 2006). Lindahl *et al.* ont quant à eux observé une proportionnalité entre diminution du taux d'hémoglobine et concentration plasmatique en ribavirine (Lindahl *et al.*, 2004), donnée appuyée par d'autres études (Saito *et al.*, 2006). Ainsi, on observe une chute de l'hémoglobine à moins de 8,5 g/dl quand les concentrations plasmatiques en ribavirine sont supérieures à 3,5 µg/ml (Arase *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2004).

7 à 10% des patients souffrent d'une anémie sévère avec un taux d'hémoglobine <10g/dl (Chang *et al.*, 2002; Poynard *et al.*, 1998). Deux grands essais pivots ont montré qu'une diminution des doses de ribavirine (et/ou d'interféron) a été nécessaire chez 33 à 42% des patients et 10 à 13% l'ont arrêté à cause de cet effet indésirable responsable le plus souvent d'une asthénie affectant leur qualité de vie (Hadziyannis *et al.*, 2004; Manns *et al.*, 2001).

5. Facteurs prédictifs de l'anémie sous ribavirine

Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer l'existence d'un ou plusieurs facteurs susceptibles de prévenir l'anémie induite par la ribavirine et ainsi permettre une meilleure prise en charge du patient. Plusieurs paramètres ont montré une corrélation avec un risque de delta d'hémoglobine important (Fried, 2002) :

- L'âge > 50 ans
- Le sexe féminin
- Le faible poids corporel (<65 kg) (Hung *et al.*, 2006)
- Le taux de plaquettes en pré-traitement (<150 000/mm³)
- L'hémoglobine basale (Van Vlierbergh *et al.*, 2001)
- Une faible clairance à la créatinine (Reau *et al.*, 2008)
- Une diminution rapide de l'hémoglobine (>1,5-2 g/dl) en 15 jours (Reau *et al.*, 2008)

- De hautes doses de ribavirine (>12 mg/kg)
- Le phénotype d'haptoglobine (Hp1-1) (Van Vlierbergh *et al.*, 2001)
- Le génotype de l'ITPA (inosine triphosphatase) et la diminution de son activité (Thompson *et al.*, 2010)

Aucun consensus thérapeutique concernant les facteurs prédictifs n'a été défini pour l'instant.

II. OBJECTIFS

L'équipe de Peter Ferenci a observé que les femmes préménopausées étaient moins sujettes à développer une anémie sous ribavirine (Scherzer *et al.*, 2013) que les femmes ménopausées. Notre équipe avait émis l'hypothèse que les différences entre ces deux populations pouvaient concerner leurs taux en hormones telles que le β -œstradiol, l'œstradiol, l'œstrone, la progesterone, l'androstènedione ou la DHEA. Elle a alors utilisé un test *in vitro*, développé par le Dr. E. Brochot, traité des globules rouges avec chacune de ces molécules et a ainsi montré que la DHEA réduisait l'hémolyse induite par la ribavirine (Brochot *et al.*, 2014; Brochot *et al.*, 2012).

Récemment, notre groupe a confirmé ces résultats *in vivo* chez 108 patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite C et traités par une association médicamenteuse à base de ribavirine (Bodeau *et al.*, 2017). Les taux plasmatiques bas de DHEA étaient étroitement associés à une chute de l'hémoglobine à 12 semaines de traitement ($p=0,002$).

La DHEA a été décrite dans de nombreuses études comme un inhibiteur non compétitif de la G6PD par liaison au complexe enzyme-substrat (Gordon *et al.*, 1995; Marks et Banks, 1960).

On sait également que la G6PD est une enzyme clef dans la voie des Pentoses Phosphates qui joue un rôle important au sein des érythrocytes humains dans lesquels la glycolyse est la seule source d'énergie sous forme d'ATP. Partant de ce faisceau d'informations, nous avons décidé d'explorer le mécanisme d'action pouvant expliquer au moins en partie l'effet inhibiteur de la DHEA de l'hémolyse induite par la ribavirine. Cette exploration passe par la revue des effets néfastes de la ribavirine sur les hématies et des effets bénéfiques de la DHEA sur le pool d'ATP érythrocytaire. Nous avons également étudié la voie des pentoses phosphates et l'effet de ces drogues dans un modèle viral, *in vitro*.

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Produits chimiques

La ribavirine, la DHEA, l'ionomycine et le maléimide proviennent de chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France)

- Prélèvement et préparation des globules rouges

Le sang humain a été prélevé chez des volontaires sains (n=5) par veinoponction et collecté sur des tubes contenant du citrate 3,2% à l'action anticoagulante. Après élimination du plasma et de la couche leucoplaquettaire par centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes, les globules rouges ont été lavés 3 fois avec du tampon HEPES à pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 136 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 1 mM, Glucose 5 mM) à température ambiante puis centrifugés à 100 g pendant 5 minutes pour éliminer le tampon. Les globules rouges ont ensuite été suspendus dans du tampon HEPES à une concentration de 1.10^8 globules rouges/ml en présence de 50 U/ml de pénicilline G et de 50µg/ml de streptomycine. Les hématies ont été utilisées le jour même.

- Traitement des érythrocytes par la DHEA et la ribavirine

La ribavirine a été préparée dans du tampon HEPES à une concentration de 40 mM et diluée aux différentes concentrations souhaitées. La DHEA a d'abord été dissoute dans de l'éthanol à une concentration de 40 mM. Les érythrocytes à une concentration de 1.10^8 globules rouges/ml dans 2 ml de tampon HEPES ont été incubés pendant 1 à 3 jours à 37°C sous une agitation douce (60 rpm) avec des concentrations croissantes de ribavirine (10, 20, 50, 100, 300, 500 µM, 1 ou 2 mM) ou des concentrations croissantes de DHEA (10, 20, 50, 100 ou 200 µM). Des co-incubations ont aussi été réalisées avec l'association de DHEA et de ribavirine sur les globules rouges afin de comparer les composés seuls avec leur combinaison.

- Dosage de l'ATP intraérythrocytaire

Les globules rouges traités et non traités ont d'abord été dilués (1/10) dans 100 µL de PBS et leur ATP intracellulaire mesurée grâce au kit « Cell Titer-Glo » (Promega, France) en suivant le protocole du fabricant. Les valeurs d'unités relatives de luminescence (RLU) ont été normalisées à 100% sur la base des érythrocytes fraîchement obtenus.

- **Mesure de la taille des érythrocytes et de l'exposition de la phosphatidylsérine à leur surface**

Les globules rouges traités ou non ont été dilués (1/10) et marqués avec 3 μ L d'Annexine V-FITC (BD Biosciences) pendant 15 minutes à 4°C, en suivant les recommandations du fabricant. Le contrôle positif a été obtenu par traitement des globules rouges avec 3 μ L de ionomycine diluée dans de l'éthanol pour une concentration finale de 30 μ M. Les données ont été analysées pour 10 000 événements/échantillon sur le logiciel du cytomètre de flux MACSQuant (Miltenyi Biotec). Les valeurs de FSCs (Forward Light Scatter ou diffusion de la lumière) ont été utilisées pour estimer la taille des GRs qui est la principale composante définissant le signal FSC.

- **Mesure de l'hémolyse induite par la ribavirine**

Après 72 heures d'incubation à 37°C avec chaque drogue seule ou leur combinaison, les globules rouges sont éliminés par centrifugation et l'hémoglobine libérée dans le surnageant recueilli, est mesurée sur spectrophotomètre d'absorption à 540 nm. Le taux d'hémolyse est calculé par comparaison avec une valeur correspondant à 100% d'hémolyse et obtenue par ajout d'eau distillée sur les globules rouges (Brochot *et al.*, 2012).

- **Test d'inhibition de la glucose-6-phosphate déshydrogénase**

Pendant le traitement des globules rouges à la DHEA et à la ribavirine décrit ci-dessus, nous avons évalué l'inhibition de la G6PD par la DHEA à 30 minutes et 3 heures par dosage du NADPH à 340 nm (Beutler *et al.*, 1977). Pour ce faire, un test commercial standard a été utilisé (Biolabo, France). Le maléimide 12 mM a été ajouté pour éviter l'interférence d'une éventuelle production de NADPH par une autre voie impliquant le 6-phosphogluconate déshydrogénase (Deutsch, 1978), inhibée par la drogue. Les changements linéaires d'absorbance à 340 nm ont été mesurés toutes les minutes pendant 30 minutes sur un lecteur de microplaque (Sunrise, Tecan, Suisse).

- **Test d'inhibition de la charge virale par la ribavirine seule ou en association avec la DHEA**

L'activité antivirale de la ribavirine 2 mM seule ou en association avec la DHEA 200 μ M a été évaluée et comparée par l'utilisation d'un test de réduction de la charge virale. La souche Nancy de Coxsackie B3 (CVB3) a été obtenue à partir de l'ADNc plasmidique pCB3 Nancy (Klump *et al.*, 1990) et cultivé sur cellules HeLa avec du milieu de culture DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Des solutions de CVB3 préalablement traité ou non, ont été utilisées à des dilutions sérielles de 10 en 10, pour infecter en triplicate des cellules HeLa en plaques 96 puits (Jiang

et al. , 2017). L'apparition d'un effet cytopathique caractéristique de cet entérovirus a été observée au bout de 4 jours (96h). A partir de ces données, il est possible de calculer la charge virale responsable de 50% de l'infection des cellules (ccid50/mL) en utilisant la formule de Reed et Muench (Reed LJ, 1938). Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du test t de Student sur la base des valeurs des titres viraux mesurés et exprimés en log (Richardson et Overbaugh, 2005). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

- **Analyse statistique**

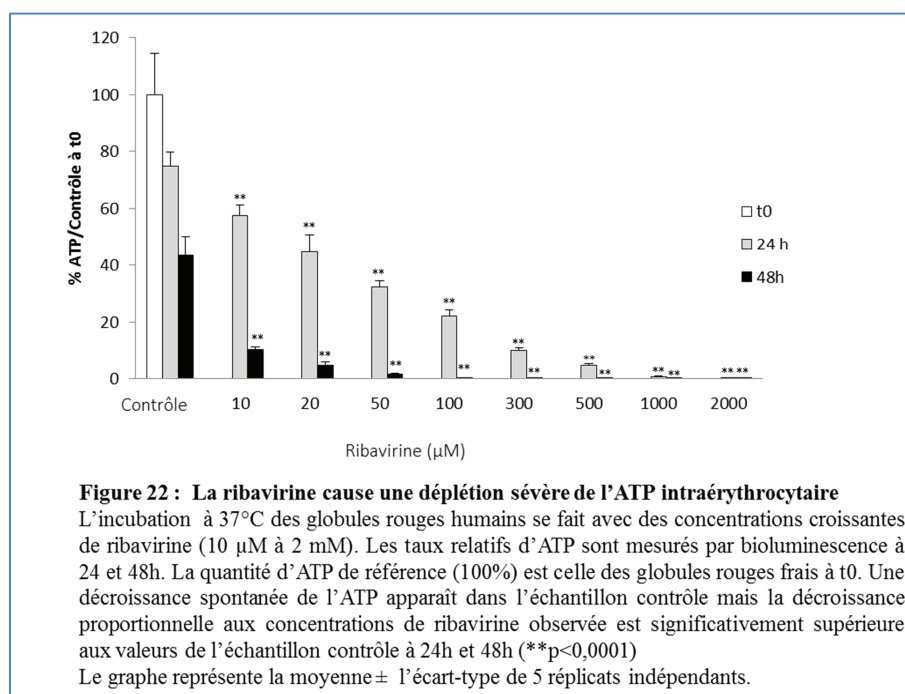
A moins que ce ne soit précisé, tous les tests statistiques ont été réalisés en prenant en compte des triplicats analysés par un test t de Student. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

IV. RESULTATS

Nous avons d'abord cherché à montrer l'effet de la ribavirine seule sur le pool d'ATP érythrocytaire.

A. La ribavirine cause une déplétion sévère de l'ATP intraérythrocytaire

La quantification relative de l'ATP intracellulaire après incubation des globules rouges avec 10, 20, 50, 100, 300, 500, 1000 ou 2000 μM de ribavirine est montrée en Figure 22. Les érythrocytes frais sont considérés comme contenant 100 % d'ATP à t_0 , juste après prélèvement et lavage. Une décroissance spontanée de l'ATP apparaît dans l'échantillon contrôle de globules rouges, mais la ribavirine est responsable d'une déplétion hautement plus significative à 24 et 48 h. A 24h, il reste seulement $77 \pm 5,0\%$, $60 \pm 8,2\%$, $43 \pm 2,9\%$, $30 \pm 3,0\%$ et $14 \pm 1,3\%$ d'ATP intracellulaire dans les échantillons contenant les concentrations respectives de ribavirine en comparaison avec l'échantillon contrôle au même moment ($p < 0,0001$). A 48h, il ne reste que $24 \pm 2,4\%$, $11 \pm 3\%$, $4 \pm 0,6\%$ et $1 \pm 0,1\%$ d'ATP dans les globules rouges avec des concentrations en ribavirine de 10, 20, 50 et 100 μM respectivement, en comparaison avec l'échantillon contrôle au même instant ($p < 0,0001$) et pratiquement plus d'ATP dans les échantillons contenant $\geq 300 \mu\text{M}$ de ribavirine.



Puis nous avons voulu voir l'effet de la DHEA sur le pool d'ATP érythrocytaire.

B. La DHEA limite la diminution spontanée de l'ATP intracellulaire

La quantification relative de l'ATP intracellulaire après incubation avec 10, 20, 50, 100 ou 200 μM de DHEA est montrée en Figure 23. De façon intéressante, la DHEA est capable de prévenir la décroissance spontanée d'ATP au cours du temps dans les GR. A 24h, comparé au contrôle au même moment, le contenu en ATP est 115 à 125% fois supérieur ($p < 0,05$). Cette différence est encore plus accentuée à 48h et l'ATP intracellulaire est $1,8 \pm 0,13$, $1,9 \pm 0,08$, $2,2 \pm 0,16$, $2,3 \pm 0,13$ et $2,4 \pm 0,12$ fois plus élevée que dans l'échantillon contrôle au même moment, aux concentrations de DHEA respectives ($p < 0,0001$).

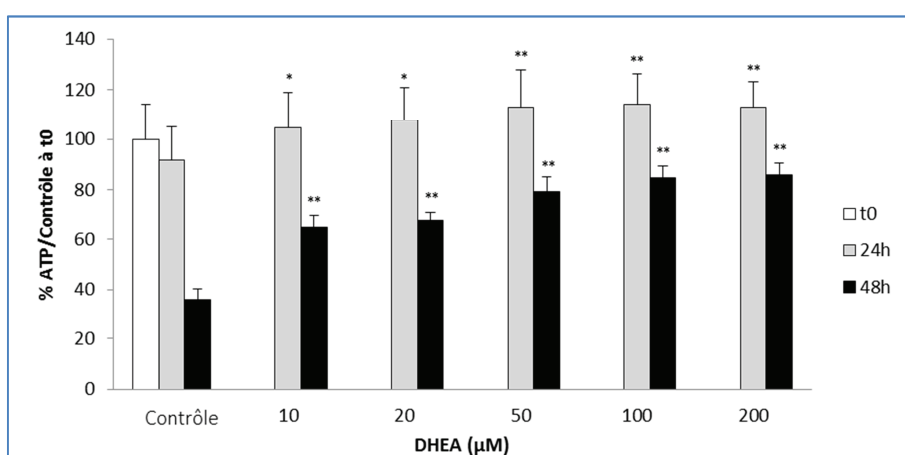


Figure 23 : La DHEA limite la diminution spontanée de l'ATP intracellulaire

L'incubation à 37°C des globules rouges humains se fait avec des concentrations croissantes de DHEA (10 à 200 μM) pendant 24 et 48 h. Les taux relatifs d'ATP sont mesurés par bioluminescence à 24 et 48h. La quantité d'ATP de référence (100%) est celle des globules rouges frais à t0.

La quantité d'ATP de 10 μM à 200 μM augmente de façon significative à 24 h et 48 h (* $p < 0,05$ and ** $p < 0,0001$, respectivement).

Le graphe représente la moyenne \pm l'écart-type de 5 réplicats indépendants.

Les effets de la ribavirine et de la DHEA étant opposés sur le pool d'ATP érythrocytaire, nous avons voulu tester l'association des deux molécules pour en voir l'effet cumulé sur le pool d'ATP érythrocytaire.

C. La DHEA permet d'empêcher la déplétion sévère d'ATP, induite par la ribavirine

L'ATP intracellulaire est quantifiée en parallèle après incubation des érythrocytes avec de la ribavirine 2 mM avec ou sans DHEA 200 μ M. Les résultats de la quantification relative sont montrés en Figure 24. Comme précédemment observé, la ribavirine 2 mM entraîne une déplétion sévère de près de 99% du stock d'ATP en moins de 24h. A 24h, en présence de DHEA, $33 \pm 11,7\%$ d'ATP était encore présent *versus* $0,58 \pm 0,15\%$ pour le même échantillon avec seulement de la ribavirine ($p < 0,001$). A 48h, $3,7 \pm 2,3\%$ d'ATP restaient encore au sein des globules rouges traités à la DHEA et à la ribavirine *versus* $0,09 \pm 0,01\%$ pour les échantillons ne contenant que de la ribavirine ($p < 0,05$). Néanmoins, les valeurs obtenues en présence de ribavirine et DHEA sont significativement inférieures à celles du contrôle négatif ($p < 0,05$).

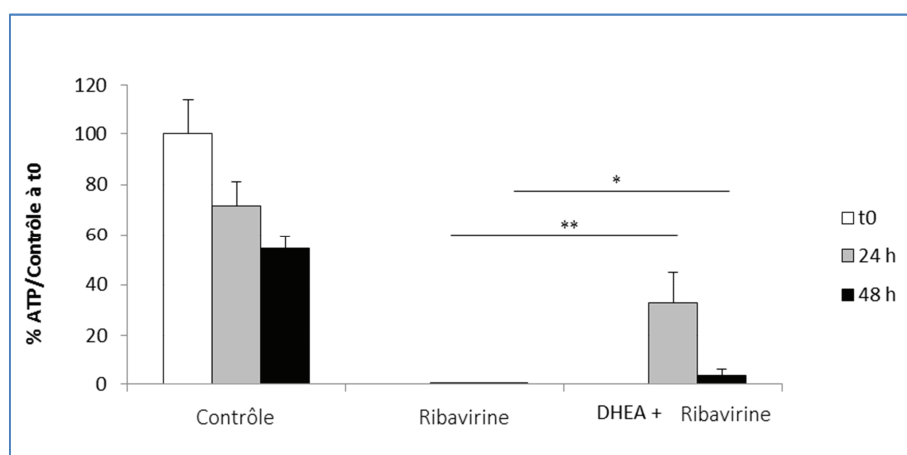


Figure 24 : La DHEA permet d'empêcher la déplétion sévère d'ATP, induite par la ribavirine.

Effet de la combinaison de la ribavirine 2mM et de la DHEA 200 μ M après incubation des globules rouges à 37°C, pendant 24 et 48h. Les taux relatifs d'ATP sont mesurés par bioluminescence à 24 et 48h. La quantité d'ATP de référence (100%) est celle des globules rouges frais à t0.

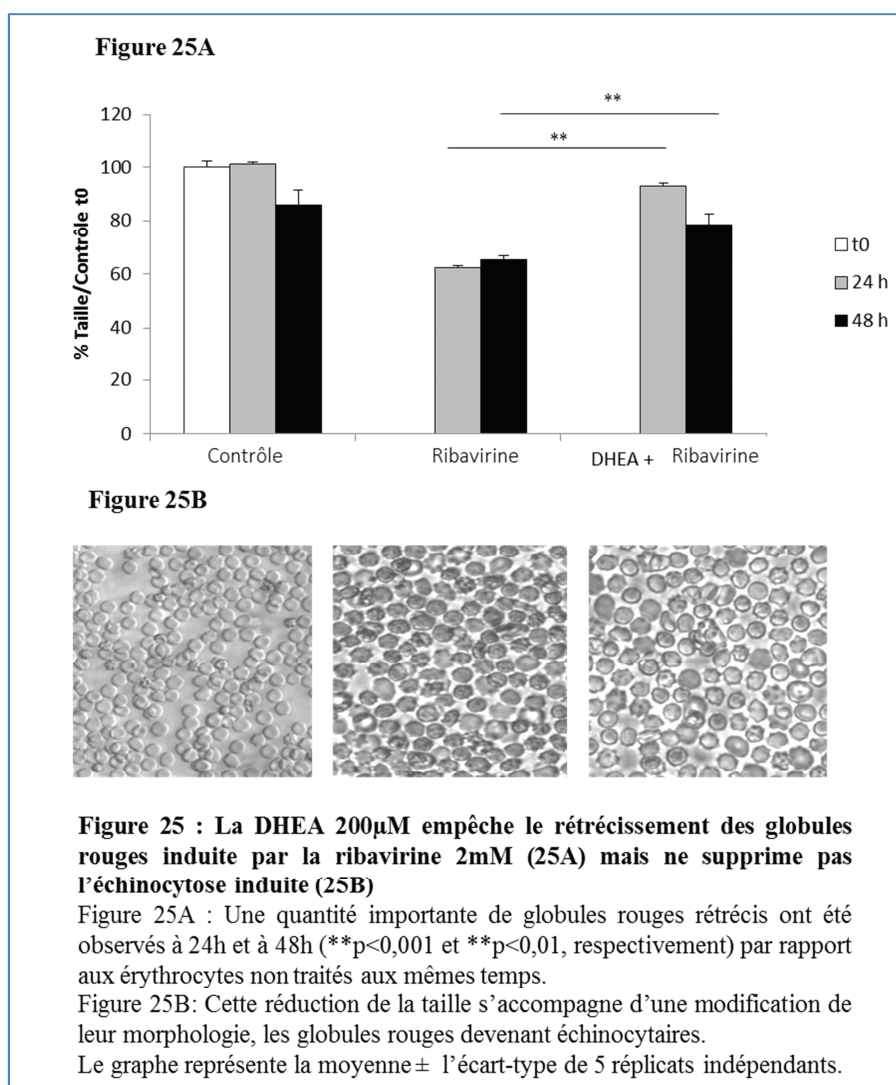
Le contenu d'ATP est significativement plus élevé en présence de DHEA comparé à la ribavirine seule à 24 h et 48 h (** $p < 0,01$ and * $p < 0,05$, respectivement).

Le graphe représente la moyenne \pm l'écart-type de 5 réplicats indépendants.

Après avoir montré que la DHEA était capable de préserver le pool d'ATP des globules rouges, nous avons observé d'autres paramètres du globule rouge : taille, forme, exposition des phosphatidylsérines à la membrane externe pour voir s'ils étaient modifiés également.

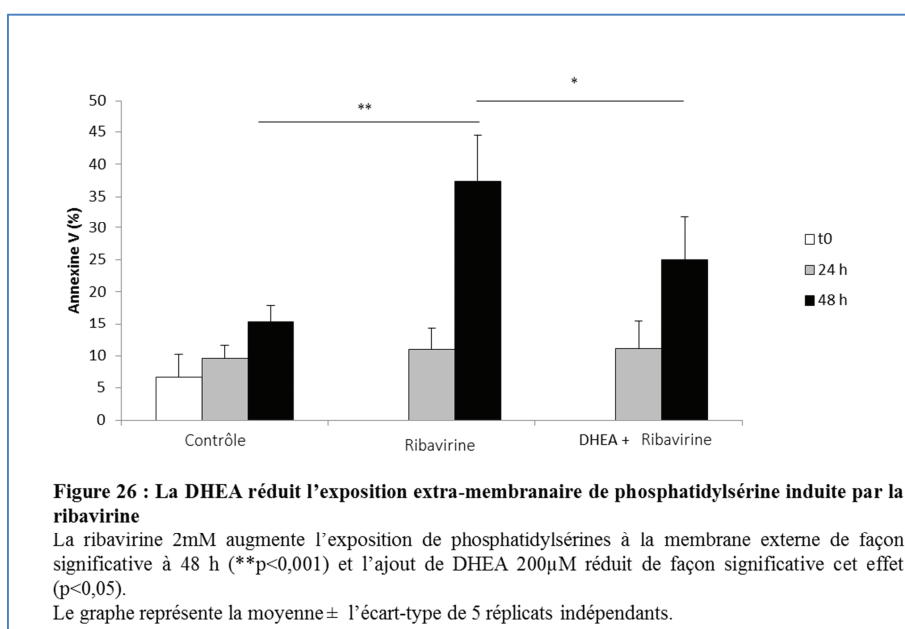
D. La DHEA empêche le rétrécissement des globules rouges

La taille des érythrocytes est évaluée par mesure du FSC au cytomètre de flux comme montré sur la Figure 25A. Une quantité importante de globules rouges rétrécis ont été observés à 24h et à 48h : $62 \pm 2,1\%$ ($p < 0,001$) et $65 \pm 1,8\%$ ($p = 0,001$), respectivement par rapport aux érythrocytes non traités aux mêmes temps. Cette réduction de la taille s'accompagne d'une modification de leur morphologie, les globules rouges devenant échinocytaires. L'addition de DHEA 200 μM à la ribavirine amoindrit ce rétrécissement puisque la taille des globules rouges est par rapport au contrôle de $93 \pm 8\%$ à 24h et de $78 \pm 4,3\%$ à 48h avec $p < 0,001$ et $p < 0,01$ respectivement. La taille est restaurée par la DHEA et n'est pas statistiquement différente de celle du contrôle. Leur morphologie comme représenté sur la Figure 25B n'est cependant pas corrigée et demeure échinocytaire.



E. La DHEA réduit l'exposition extra-membranaire de phosphatidylsérine induite par la ribavirine

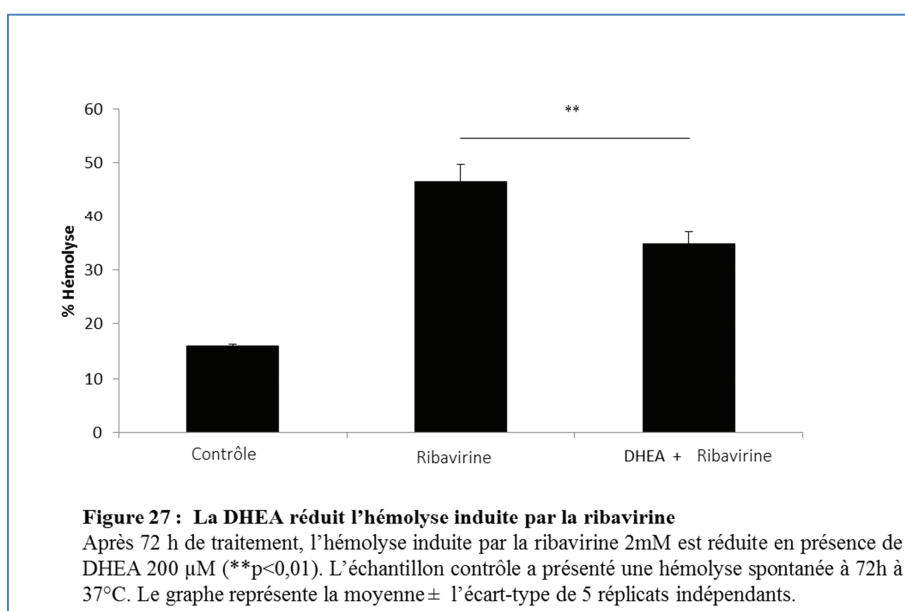
Les érythrocytes dans le tampon HEPES ont été incubés pendant 24h ou 48h avec de la ribavirine 2 mM avec ou sans DHEA 200 μ M. L'exposition de la phosphatidylsérine au niveau de la membrane externe des globules rouges a été mesurée en utilisant de l'annexine V marqué avec un fluorophore FITC. On observe que la ribavirine augmente le pourcentage de cellules positives pour l'Annexine V de $11 \pm 3,2\%$ à 24h (non significatif) et de $37 \pm 71\%$ à 48h ($p < 0,01$) comme représenté sur la Figure 26. L'ajout de DHEA 200 μ M à la ribavirine a entraîné une diminution significative de cette exposition à 48h avec $25 \pm 7\%$ d'Annexine V à 48 h ($p < 0,05$).



Ensuite, nous avons voulu confirmer l'effet protecteur *in vitro* de la DHEA contre l'hémolyse induite par la ribavirine.

F. La DHEA réduit l'hémolyse induite par la ribavirine

L'hémolyse induite par la ribavirine a été évaluée par mesure de l'hémoglobine relarguée dans le surnageant des globules rouges en réalisant une lecture à 540 nm au spectrophomètre. Les résultats sont présentés sur la Figure 27. Après 72 h de traitement, l'hémolyse induite par la ribavirine 2 mM est de $47 \pm 3,3\%$ versus $35 \pm 2,3\%$ après ajout de DHEA 200 μM à la ribavirine ($p < 0,01$). L'hémolyse mesurée en présence des 2 drogues demeure significativement plus élevée que comparée au contrôle ($p < 0,05$).



Etant donné l'ensemble des modifications et en particulier celles sur le pool d'ATP causées par la DHEA, nous avons décidé d'explorer les voies métaboliques du globule rouge, responsables de la formation d'ATP, et particulièrement la voie des pentoses phosphates dont l'enzyme clef est la G6PD.

G. La DHEA inhibe la G6PD en présence de ribavirine

L'inhibition de la G6PD a été mesurée après 30 minutes et 3 heures à 37°C dans les globules rouges traités par des doses croissantes de DHEA (10, 50, 100 et 200 µM) en présence ou non de ribavirine 2 mM. Les résultats sont montrés sur la Figure 28. A 30 minutes, l'inhibition de la G6PD est de $2,88 \pm 1,6\%$, $9,68 \pm 2,7\%$, $11,10 \pm 0,8\%$ et $16,5\% \pm 1,5\%$ sans ribavirine *versus* $1,92 \pm 1,1\%$; $8,19 \pm 1,9\%$, $12,8 \pm 2,8\%$ et $17,3 \pm 2,6\%$ avec ribavirine 2mM aux concentrations en DHEA de 10, 50, 100 et 200 µM, respectivement. Ces inhibitions sont significatives pour toutes les conditions en comparaison avec le contrôle ($p < 0,01$). Aucune différence significative n'a été retrouvée en absence ou en présence de ribavirine à 30 minutes. A 3h, l'inhibition de la G6PD était de $4,93 \pm 1,7\%$, $11,73 \pm 2,2\%$, $15,84 \pm 1,5\%$ et $19,37 \pm 3,7\%$ sans ribavirine *versus* $9,56 \pm 0,9\%$, $17,03 \pm 2,0\%$, $18,83 \pm 2,5\%$ et $21,24 \pm 3,4\%$ avec de la ribavirine. Cette inhibition était significative pour toutes les conditions comparées au contrôle. Les résultats étaient significativement différents en présence ou en absence de ribavirine pour les concentrations de DHEA testées les plus faibles soit 10 et 50 µM.

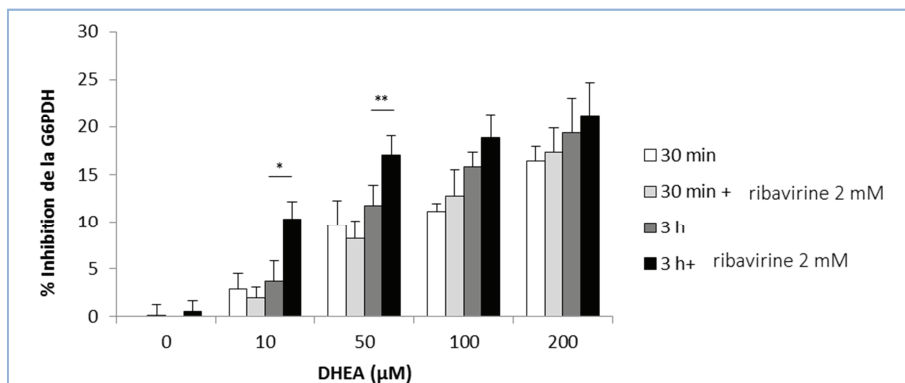


Figure 28 : La DHEA inhibe la G6PD en présence de ribavirine

L'inhibition a été mesurée à 30 min et 3h à 37°C sur des globules rouges traités avec de la ribavirine 2 mM et différentes concentrations de DHEA (0 à 200 µM). Cette inhibition était significative comparée au contrôle au même moment ($p < 0,01$)

L'inhibition de la G6PD de $4,9 \pm 1,7\%$ à $19,4 \pm 3,7\%$ est proportionnelle aux concentrations croissantes de DHEA (10 à 200 µM respectivement) et significativement supérieure comparée au contrôle au même moment ($p < 0,01$).

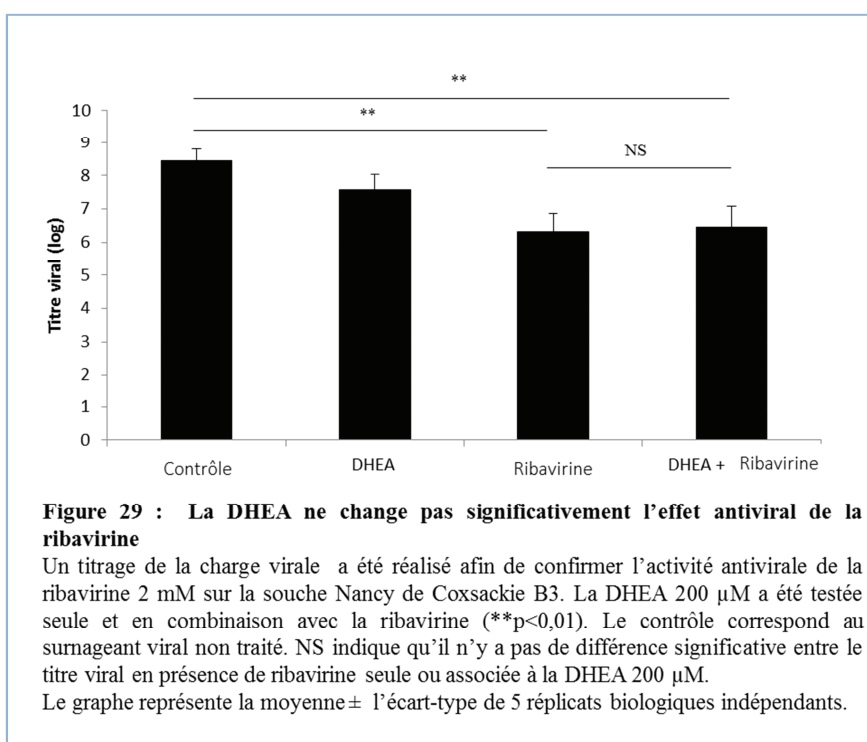
L'ajout de ribavirine augmente l'inhibition de la G6PD de $9,56\% \pm 0,9\%$ to $21,2 \pm 3,4\%$. Cette augmentation est significative pour des concentrations de DHEA de 10 µM ($*p < 0,05$ et $**p < 0,01$, respectivement).

Le graphe représente la moyenne \pm l'écart-type de 5 réplicats biologiques indépendants.

Pour finir, nous avons voulu voir si la DHEA, bénéfique contre l'hémolyse, n'entravait pas l'effet antiviral de la ribavirine. Pour ce faire, nous avons choisi le Coxsackie B3, virus à ARN simple brin dont la multiplication est inhibée par la ribavirine (Okada *et al.*, 1992).

H. La DHEA ne change pas significativement l'effet antiviral de la ribavirine

Le titrage de la charge virale de CVB3 a confirmé l'effet antiviral de la ribavirine 2 mM sur la souche Nancy du virus Coxsackie B3 ($6,3 \pm 0,5$ log *versus* $8,5 \pm 0,4$ log dans l'échantillon contrôle avec $p < 0,0001$). La DHEA 200 μ M a également été testée seule et a montré une efficacité antivirale significative sur le titre viral ($7,6 \pm 0,5$ log, $p < 0,001$) et la combinaison ribavirine + DHEA aussi ($6,4 \pm 0,6$ log, $p < 0,0001$). Néanmoins, aucune synergie d'action n'a été mesurée, l'efficacité de la ribavirine seule n'étant pas statistiquement différente de celle de la combinaison comme montré sur la Figure 29.



V. DISCUSSION

L'entrée puis la phosphorylation de la ribavirine dans le globule rouge entraîne une accumulation de RMP, RDP et RTP à cause d'un déficit en enzymes nécessaires à la déphosphorylation de ces métabolites (Inoue *et al.*, 2006). Cette accumulation mène à une déplétion d'ATP, l'adénosine kinase étant l'enzyme principale de la phosphorylation de la ribavirine (Page et Connor, 1990). De précédentes observations ont été confirmées avec nos conditions expérimentales (De Franceschi *et al.*, 2000; Homma *et al.*, 2009; Kleinegris *et al.*, 2012). L'ATP est rapidement déplétée à partir d'une concentration en ribavirine de 10 μM (Figure 22), qui correspond aux taux thérapeutiques de ribavirine décrits chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C (van Soest *et al.*, 2009). La diminution de taille et de morphologie des globules rouges (Figures 25A et 25B) et l'exposition de la phosphatidylsérine au niveau de la membrane externe (Figure 26) ont été observées à 24 et 48 heures après incubation à 37°C. A 72h, la ribavirine 2 mM a induit une hémolyse significative (Figure 27) (Brochot *et al.*, 2012). Le déficit en ATP pourrait causer une perturbation de la glycolyse qui est la seule source d'énergie du globule rouge. Ce dysfonctionnement est probablement la cause initiale de l'anémie induite par la ribavirine parce que le maintien de l'intégrité membranaire nécessite des enzymes ATP-dépendantes comme l'aminophospholipide translocase (Kleinegris *et al.*, 2012) ainsi qu'une protection des dommages oxydatifs, via la voie des pentoses phosphates. Cette voie également appelée shunt des hexoses monophosphates est corrélée à la glycolyse (De Franceschi *et al.*, 2000). Des études cliniques et *in vitro* sur l'hémolyse nous ont mené à la conclusion qu'il y avait une corrélation entre le taux de DHEA et un effet protecteur significatif contre l'anémie induite par la ribavirine (Bodeau *et al.*, 2017; Brochot *et al.*, 2014; Scherzer *et al.*, 2013). De ce fait, nous nous sommes intéressés au mécanisme par lequel la DHEA pouvait agir sur les GR. L'effet protecteur de la DHEA sur l'ATP contenu dans les érythrocytes est représenté en Figure 23 de 10 à 200 μM où l'on voit qu'un taux d'ATP significativement plus important a été retrouvé dans les globules rouges traités en comparaison aux échantillons contrôles. Nous avons réalisé d'autres expérimentations après 48h et jusque 72h, à de fortes concentrations en ribavirine (2mM) et en DHEA (200 μM) car il nous fallait atteindre des concentrations intraérythrocytaires similaires aux taux à l'équilibre obtenus cliniquement au cours d'une thérapie (0,8 à 1,6 mM) et afin d'obtenir une pénétration efficace de DHEA dans les globules rouges (Morsches *et al.*, 1981; Schopf *et al.*, 1986). Exceptée la mesure de l'hémolyse réalisée à 72h (Figure 27), nous ne reportons pas nos autres données à 72h parce que l'hémolyse significative observée à ce stade biaise la mesure des autres paramètres.

Les résultats montrent que l'ajout de DHEA réduit de façon significative le rétrécissement des globules rouges à 24 et 48 h (Figure 28) et l'externalisation des phosphatidylsérines induite par la ribavirine à 48h ainsi que l'hémolyse induite à 72h comme rapporté précédemment (Brochot *et al.*, 2014).

La combinaison de la DHEA avec la ribavirine n'a pas changé de façon significative l'effet antiviral de la ribavirine. Mais nous nous sommes aperçu que la DHEA seule avait un effet antiviral significatif sur la souche Nancy du virus Coxsackie B3. Des effets antiviraux *in vitro* similaires avaient été rapportés dans d'autres études sur de nombreux autres virus et un effet synergique ou additionnel aurait pu être attendu compte tenu des résultats d'autres études (Torres *et al.*, 2012). Néanmoins, dans le contexte de la thérapie contre le virus de l'hépatite C, à base de ribavirine, aucune corrélation significative n'a été obtenue entre le taux de DHEA endogène et la réponse au traitement.

La DHEA ayant été décrite comme un inhibiteur de la G6PD dans de nombreuses études (Marks et Banks, 1960), on pouvait poser l'hypothèse que l'inhibition partielle de la voie des pentoses phosphates est suffisante pour récupérer assez d'ATP pour prévenir ou limiter l'anémie induite par la ribavirine. Comme montré sur la Figure 28, nous avons confirmé la pénétration rapide de la DHEA dans les globules rouges comme rapporté précédemment (Morsches *et al.*, 1981) et l'inhibition significative de la G6PD par la DHEA en présence ou en absence de la ribavirine. Une très faible voire aucune inhibition par la ribavirine seule n'a été observée alors que comme prévu, la DHEA a inhibé la G6PD de façon dose-dépendante, avec une inhibition de 5% avec 10 μM de DHEA et environ 20% à 200 μM . Étonnamment, l'association de DHEA avec la ribavirine (2mM) a exacerbé cette inhibition, qui est significative à 10 μM et 50 μM de DHEA ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement). Aucune raison simple ne peut être avancée pour expliquer cette synergie, mais l'inhibition de la G6PD nécessite la formation d'un complexe ternaire composé de NADP⁺, de glucose-6-phosphate et de l'enzyme (Gordon *et al.*, 1995). Aussi, les concentrations relatives en substrats et enzymes pourraient changer en présence de ribavirine, ce qui pourrait expliquer les différences observées en ce qui concerne l'inhibition de la G6PD.

La concentration en DHEA-S est plus élevée chez les jeunes adultes femmes et hommes de 18-30 ans, soit environ 1,19-9,00 μM et 2,41-12,38 μM , respectivement. Les valeurs moyennes décroissent ensuite chez les deux sexes avec quelques variabilités individuelles. La DHEA-S est la forme circulante et de stockage de la DHEA et une balance permanente existe entre les deux. Le DHEA-S a été également testé en parallèle et des résultats similaires ont été obtenus (données non montrées). Dans cette étude, une concentration en DHEA de 10 μM est capable de « sauver » de l'ATP intracellulaire de globules rouges *in vitro* (Figure 23). Des études biochimiques avec l'enzyme

purifiée ont montré qu'1 μ M de DHEA était capable d'inhiber environ 30% de l'activité G6PD (Marks et Banks, 1960). Dans des conditions normales et sans stress, seulement 5-10% du glucose total est consommé dans la voie des pentoses phosphates initiée par la G6PD qui agit à moins de 1% de sa capacité (Thorburn et Kuchel, 1985). Dans ces conditions, de faibles taux de DHEA et une inhibition partielle de la G6PD pourraient être suffisants pour préserver un niveau d'ATP acceptable dans les globules rouges qui seraient encore capables de résister au stress oxydant via la voie des PPP. Les résultats obtenus dans cette étude favorisent l'hypothèse que la déplétion en ATP est le point de départ et le facteur le plus important de l'anémie induite par la ribavirine. Dans des situations critiques, l'inhibition de la G6PD par une concentration suffisante de DHEA pourrait préserver assez d'ATP pour prévenir ou limiter l'anémie.

Nous avons montré à travers ces différentes expériences, qu'avoir un taux suffisant de DHEA endogène pendant un traitement à base de ribavirine pourrait être suffisant pour préserver un pourcentage d'ATP significatif et pourrait expliquer l'impact clinique de la DHEA dans la prévention de l'anémie. Au cours d'une étude clinique, la valeur seuil de prédiction d'une anémie induite par la ribavirine avec moins de 11g/dl d'hémoglobine était < 1500 ng/ml de DHEA-S soit 3,9 μ M (Bodeau *et al.*, 2017). Ce niveau physiologique peut être facilement atteint si nécessaire par une supplémentation orale standard de 25 à 50 mg de DHEA/jour (Leowattana, 2004) qui a déjà montré sa totale innocuité.

Ainsi, une association à base de ribavirine avec de faibles doses de DHEA pourrait être une stratégie utile et peu coûteuse pour les patients présentant un faible taux endogène de DHEA-S et permettrait de ne pas diminuer ou arrêter la prise de l'antiviral à cause d'une chute contraignante du taux d'hémoglobine. Par ailleurs, les expériences *in vitro* suggèrent que des doses supérieures de ribavirine pourraient alors être utilisées avec 10 μ M (ou plus) de DHEA-S. Cette observation pourrait être importante puisque le taux de succès thérapeutique d'une thérapie à base de ribavirine est dose-dépendante. Cela est particulièrement intéressant dans le traitement de l'hépatite E chronique où une thérapie prolongée à base de ribavirine est nécessaire à l'éradication de l'infection virale. Maintenir les doses de ribavirine à des concentrations aussi hautes que possible et éviter toute diminution du traitement à cause de ses effets indésirables est important pour améliorer le taux de succès et éviter la sélection de virus résistants à la ribavirine (Todt *et al.*, 2016). La DHEA pourrait offrir des alternatives et des solutions intéressantes à ces problématiques (Hamilton *et al.*, 2012).

Des travaux ont montré qu'il était important pour le succès du traitement d'administrer la dose optimale de ribavirine et que des réductions de sa posologie réduisaient significativement les chances de succès thérapeutique (Reddy *et al.*, 2007).

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nos résultats suggèrent que le principal mécanisme via lequel la DHEA préviendrait l'anémie induite par la ribavirine passe par une préservation du pool d'ATP intraérythrocytaire par l'inhibition de la G6PD et donc de la voie des pentoses phosphates. Notre résumé graphique récapitule le mécanisme d'action que nous proposons et les résultats principaux de cette étude (Handala *et al.*, 2017) (Figure 30).

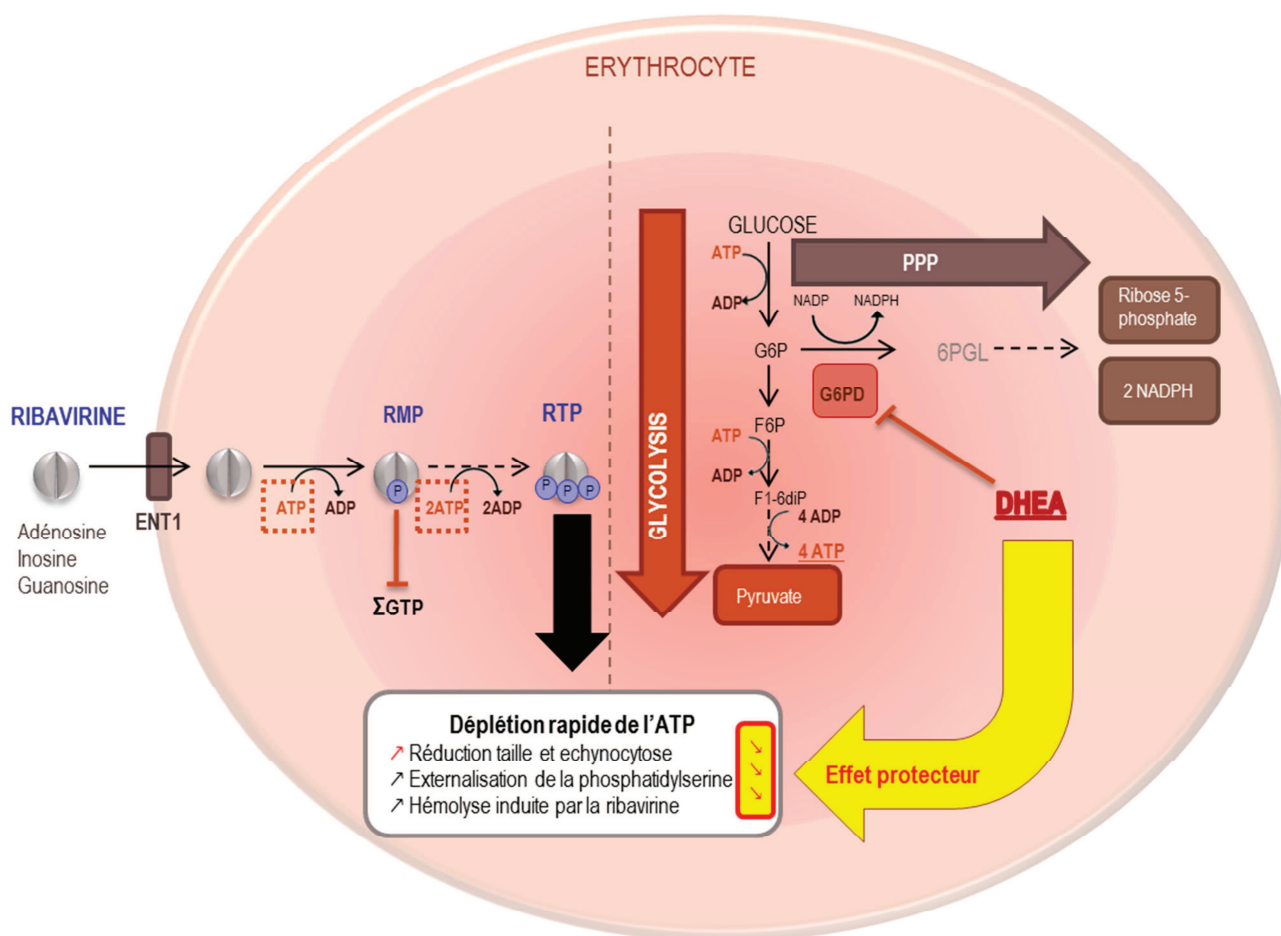


Figure 30 : Résumé graphique

La DHEA inhibe l'hémolyse induite par la ribavirine en préservant le pool d'ATP érythrocytaire par inhibition de la G6PD dans la voie des pentoses phosphates.

La préservation de l'ATP permet de maintenir le globule rouge fonctionnel plus longtemps.

Ces résultats pourraient s'avérer utiles dans l'optimisation des thérapies à base de ribavirine. Une supplémentation orale de 50 mg de DHEA a été largement testée dans plusieurs études afin de permettre de restaurer des taux plasmatiques de DHEA de l'ordre de 10 μ M chez les adultes. De plus, au cours de certaines études cliniques, des doses journalières de 1600 mg ont été administrées pendant

1 mois ne causant pas d'effets indésirables importants (Mikeladze *et al.*, 2016; Mortola et Yen, 1990; Welle *et al.*, 1990)

De ce fait, l'intérêt principal de l'utilisation de la DHEA serait de pouvoir prévenir en partie l'anémie induite par la ribavirine, voire d'augmenter les doses de ribavirine afin d'obtenir une activité antivirale plus puissante tout en limitant le risque de l'hémolyse, en particulier chez les patients présentant un ou plusieurs facteurs de risque d'anémie. Lors des traitements par bithérapie ribavirine-intéféron de l'hépatite C chronique, l'érythropoïétine recombinante a été largement administrée pour pallier l'anémie en stimulant la production de réticulocytes (Stickel *et al.*, 2012). L'EPO n'avait pas d'AMM pour cette indication et a coûté très cher (environ 1200 euros/mois). L'alternative de la DHEA aurait été d'un intérêt non négligeable. Elle reste intéressante sur le plan biologique et thérapeutique dans le contexte du traitement de l'hépatite E chronique.

Nous avons donc pour projet une étude préclinique utilisant l'association ribavirine et DHEA *in vivo*, sur des modèles murins, mais avant de pouvoir commencer il fallait d'abord tester les molécules sur des globules rouges de souris. Plusieurs problèmes nous ont contraints à abandonner cette étude : l'hémolyse spontanée de tous les échantillons de sang murin commandés chez un fournisseur spécialisé puis l'impossibilité de prélever un volume de sang suffisant directement sur les souris. Nous avons quand même initié une collaboration avec le Pr Philippe Meuleman à Gand qui a confirmé l'anémie rapide induite par la ribavirine chez les souris. Malheureusement, la formulation de la DHEA liée à son insolubilité dans l'eau n'a pas permis d'analyser ses effets pour limiter cette anémie. Notre objectif final aurait été d'utiliser son modèle de xénogreffe d'hépatocytes humains chez la souris sur lequel il a mis au point un modèle d'hépatite E chronique (Sayed *et al.*, 2017).

Cependant, nos observations cliniques et biologiques nous paraissent déjà largement suffisantes pour prendre en compte la DHEA dans le contexte du traitement de l'hépatite E chronique par la ribavirine du transplanté malgré un contexte compliqué où de nombreux paramètres peuvent interférer. En effet, l'hémolyse reste le principal effet secondaire à gérer dans ce traitement.

Il serait donc intéressant de confirmer le rôle de la DHEA *in vivo*, au cours d'une étude clinique chez des patients infectés chroniquement par le virus de l'hépatite E et traités par ribavirine. Il faudrait pour cela un nombre de sujets suffisamment important qui auraient préalablement fait l'objet d'analyses biologiques et échographiques pour s'assurer de l'absence de contre-indications et de l'utilité d'une supplémentation en DHEA (taux bas de DHEA endogène...). L'utilisation d'une dose optimale de ribavirine d'emblée permettrait d'assurer une réponse virologique soutenue efficace

et de limiter les résistances virologiques déjà décrites (Choi *et al.*, 2018; Todt *et al.*, 2016). Il n'est pas possible d'envisager un tel essai au CHU d'Amiens car une étude multicentrique nationale serait nécessaire pour inclure un nombre suffisant de patients.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu, la DHEA présente une activité antivirale sur certains virus et pourrait potentialiser l'effet de la ribavirine. Des essais sur un modèle de réplicon permettant de cultiver le virus de l'hépatite E ont montré des résultats préliminaires encourageants.

Le mécanisme d'action pléiotrope de la DHEA dont son pouvoir inhibiteur de la glycolyse pourrait utilement servir dans diverses indications et être au carrefour d'une médecine transversale. Par exemple, de nombreux virus dont des virus oncogènes utilisent principalement la glycolyse à l'instar des cellules cancéreuses : c'est l'effet Warburg. Il correspond à une production d'énergie suite à un fort taux de glycolyse. Actuellement, de nombreuses études ont pour objet de développer des antitumoraux inhibant la glycolyse. La DHEA pourrait donc être un candidat intéressant notamment dans les tumeurs viro-induites.

La compréhension de ce mécanisme est une avancée vers l'amélioration du traitement des patients par la ribavirine. Son large spectre antiviral et ses multiples mécanismes d'action en font une molécule de choix mais l'anémie qu'elle induit de façon quasiment constante chez les patients est une barrière non négligeable. La surmonter à l'aide de molécules palliatives telle que la DHEA est une solution à considérer. Par ailleurs, bien que l'hépatite C chronique soit de moins en moins traitée par la ribavirine au vu du développement d'un large panel d'antiviraux d'action directe, d'autres indications apparaissent comme l'hépatite E ou d'autres viroses émergentes sur lesquelles la ribavirine est efficace. La DHEA a montré plusieurs effets bénéfiques *in vitro* et *in vivo* et pourraient être administrée en association avec la ribavirine. Son inscription à la Pharmacopée française facilite son utilisation et sécurise sa prescription par les professionnels de santé.

Cette étude nous a permis de découvrir l'enzyme clé de la voie des pentose-phosphates qu'est la glucose-6-phosphate deshydrogénase. Le déficit en G6PD est la maladie génétique la plus répandue dans le monde probablement en fonction de l'évolution des populations dans différents contextes géographiques et des maladies infectieuses qui y sont présentes, dont en particulier le paludisme. La G6PD régule la voie de synthèse des acides nucléiques dans le contexte des infections mais aussi dans celui du cancer. Elle interagit avec p53 et est donc directement connectée avec la signalisation cellulaire. Il est donc logique qu'elle soit une cible thérapeutique privilégiée dans ces différents contextes.

L'amélioration du bénéfice-risque des médicaments déjà existants, passe par une bonne définition de l'état de santé et de la maladie du patient. Pour mieux appréhender ce contexte, et faire progresser la nosologie, de nombreux paramètres cliniques mais aussi de nombreux paramètres cellulaires et moléculaires peuvent et doivent être pris en compte, au-delà d'une classification syndromique. Des études métabolomiques de plus en plus fines montrent que le métabolisme participe pleinement à la signalisation cellulaire et que sa modulation peut permettre des optimisations thérapeutiques intéressantes. Aussi, l'utilisation de biomarqueurs tels que la DHEA ou d'autres molécules permettra de compléter des bases de données médicales exhaustives en complément d'autres facteurs tels que les facteurs de risques environnementaux, les pathologies et traitements associés, pour une médecine personnalisée ou 5P qui s'avère de plus en plus intéressante et utile compte tenu du vieillissement de la population et de ce fait de l'augmentation de l'incidence des états polyopathologiques chroniques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale dans la revue Antiviral Research : Handala, L., Domange, B., Ouled-Haddou, H., Garcon, L., Nguyen-Khac, E., Helle, F., Bodeau, S., Duverlie, G., Brochot, E., 2017. **DHEA prevents ribavirin-induced anemia via inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase.** Antiviral Res 146, 153-160. et d'un poster affiché au cours des Journées Francophones de Virologie, les 30-31 mars 2017, à l'Institut Pasteur de Paris : **Inhibition par la DHEA de l'hémolyse induite par la ribavirine.**

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arase, Y., Ikeda, K., Tsubota, A., Suzuki, F., Suzuki, Y., Saitoh, S., Kobayashi, M., Akuta, N., Someya, T., Hosaka, T., Sezaki, H., Kumada, H., 2005. Significance of serum ribavirin concentration in combination therapy of interferon et ribavirin for chronic hepatitis C. *Intervirol* 48, 138-144.
- Arlt, W., Callies, F., van Vlijmen, J.C., Koehler, I., Reincke, M., Bidlingmaier, M., Huebler, D., Oettel, M., Ernst, M., Schulte, H.M., Allolio, B., 1999a. Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency. *N Engl J Med* 341, 1013-1020.
- Arlt, W., Haas, J., Callies, F., Reincke, M., Hubler, D., Oettel, M., Ernst, M., Schulte, H.M., Allolio, B., 1999b. Biotransformation of oral dehydroepiandrosterone in elderly men: significant increase in circulating estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2170-2176.
- Backman, L., 1986. Shape control in the human red cell. *J Cell Sci* 80, 281-298.
- Balzarini, J., Lee, C.K., Herdewijn, P., De Clercq, E., 1991. Mechanism of the potentiating effect of ribavirin on the activity of 2',3'-dideoxyinosine against human immunodeficiency virus. *J Biol Chem* 266, 21509-21514.
- Baulieu, E.E., 1996. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3147-3151.
- Baulieu, E.E., 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52, 1-32.
- Baulieu, E.E., 1999. Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) et DHEA sulphate. *Acta Paediatr Suppl* 88, 78-80.
- Baulieu, E.E., Robel, P., 1996. Dehydroepiandrosterone et dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids. *J Endocrinol* 150 Suppl, S221-239.
- Baulieu, E.E., Thomas, G., Legrain, S., Lahlou, N., Roger, M., Debuire, B., Faucounau, V., Girard, L., Hervy, M.P., Latour, F., Leaud, M.C., Mokrane, A., Pitti-Ferrandi, H., Trivalle, C., de Lacharriere, O., Nouveau, S., Rakoto-Arison, B., Souberbielle, J.C., Raison, J., Le Bouc, Y., Raynaud, A., Girerd, X., Forette, F., 2000. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, et aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4279-4284.
- Beaucourt, S., Vignuzzi, M., 2014. Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication et propagation. Molecular basis of ribavirin resistance. *Curr Opin Virol* 8, 10-15.
- Benhamou, Y., Afdhal, N.H., Nelson, D.R., Shiffman, M.L., Halliman, D.G., Heise, J., Chun, E., Pockros, P.J., 2009. A phase III study of the safety et efficacy of viremagine versus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C: ViSER1 results. *Hepatology* 50, 717-726.
- Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, J.C., Lohr, G.W., Ramot, B., Valentine, W.N., 1977. International Committee for Standardization in Haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br J Haematol* 35, 331-340.
- Blauer, K.L., Poth, M., Rogers, W.M., Bernton, E.W., 1991. Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinology* 129, 3174-3179.
- Bodeau, S., Lemouel, J.P., Diouf, M., Duverlie, G., Nguyen-Khac, E., Brochot, E., 2017. Hemoglobin during ribavirin-based HCV therapy is closely related to circulating levels of DHEA. *J Med Virol* 89, 1033-1039.
- Bodenheimer, H.C., Jr., Lindsay, K.L., Davis, G.L., Lewis, J.H., Thung, S.N., Seeff, L.B., 1997. Tolerance et efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: a multicenter trial. *Hepatology* 26, 473-477.
- Bourguignon, R., Uhoda, I., Henry, F., Pierard-Franchimont, C., Pierard, G.E., 2002. [DHEA et rejuvenating intracrinology? Between reason et magic]. *Rev Med Liege* 57, 438-442.

- Brochot, E., Bodeau, S., Nguyen-Khac, E., Duverlie, G., 2014. DHEA et progesterone have a protective effect on ribavirin-induced hemolysis. *J Hepatol* 60, 897-898.
- Brochot, E., Castelain, S., Duverlie, G., Capron, D., Nguyen-Khac, E., Francois, C., 2010. Ribavirin monitoring in chronic hepatitis C therapy: anaemia versus efficacy. *Antivir Ther* 15, 687-695.
- Brochot, E., Duverlie, G., Castelain, S., Morel, V., Wychowski, C., Dubuisson, J., Francois, C., 2007. Effect of ribavirin on the hepatitis C virus (JFH-1) et its correlation with interferon sensitivity. *Antivir Ther* 12, 805-813.
- Brochot, E., Francois, C., Castelain, S., Helle, F., Van Nhien, A.N., Duchaussoy, I., Capron, D., Nguyen-Khac, E., Duverlie, G., 2012. A new tool to study ribavirin-induced haemolysis. *Antivir Ther* 17, 1311-1317.
- Browne, E.S., Wright, B.E., Porter, J.R., Svec, F., 1992. Dehydroepiandrosterone: antiglucocorticoid action in mice. *Am J Med Sci* 303, 366-371.
- Bruchfeld, A., Lindahl, K., Schvarcz, R., Stahle, L., 2002. Dosage of ribavirin in patients with hepatitis C should be based on renal function: a population pharmacokinetic analysis. *Ther Drug Monit* 24, 701-708.
- Butenandt A, T.K., 1934. Uberandrogen, einkristallisiertes männliches sexual hormon. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 229 167-184.
- Canonica, P.G., Kastello, M.D., Cosgriff, T.M., Donovan, J.C., Ross, P.E., Spears, C.T., Stephen, E.L., 1984. Hematological et bone marrow effects of ribavirin in rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 74, 163-172.
- Chang, C.C., Ou, Y.C., Raung, S.L., Chen, C.J., 2005. Antiviral effect of dehydroepiandrosterone on Japanese encephalitis virus infection. *J Gen Virol* 86, 2513-2523.
- Chang, C.H., Chen, K.Y., Lai, M.Y., Chan, K.A., 2002. Meta-analysis: ribavirin-induced haemolytic anaemia in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 16, 1623-1632.
- Choi, M., Hofmann, J., Kohler, A., Wang, B., Bock, C.T., Schott, E., Reinke, P., Nickel, P., 2018. Prevalence et Clinical Correlates of Chronic Hepatitis E Infection in German Renal Transplant Recipients With Elevated Liver Enzymes. *Transplant Direct* 4, e341.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M., 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
- Chung, B.C., Matteson, K.J., Voutilainen, R., Mohandas, T.K., Miller, W.L., 1986. Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, et expression in the placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8962-8966.
- Comer, K.A., Falany, C.N., 1992. Immunological characterization of dehydroepiandrosterone sulfotransferase from human liver et adrenal. *Mol Pharmacol* 41, 645-651.
- Crotty, S., Cameron, C., Andino, R., 2002. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J Mol Med (Berl)* 80, 86-95.
- Crotty, S., Cameron, C.E., Andino, R., 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6895-6900.
- 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.
- Dahari, H., Ribeiro, R.M., Perelson, A.S., 2007. Triphasic decline of hepatitis C virus RNA during antiviral therapy. *Hepatology* 46, 16-21.
- De Franceschi, L., Fattovich, G., Turrini, F., Ayi, K., Brugnara, C., Manzato, F., Noventa, F., Stanzial, A.M., Solero, P., Corrocher, R., 2000. Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology* 31, 997-1004.

- de Peretti, E., Forest, M.G., 1976. Unconjugated dehydroepiandrosterone plasma levels in normal subjects from birth to adolescence in human: the use of a sensitive radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 43, 982-991.
- de Peretti, E., Forest, M.G., 1978. Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. *J Clin Endocrinol Metab* 47, 572-577.
- Deutsch, J., 1978. Maleimide as an inhibitor in measurement of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Clin Chem* 24, 885-889.
- Deval, J., 2009. Antimicrobial strategies: inhibition of viral polymerases by 3'-hydroxyl nucleosides. *Drugs* 69, 151-166.
- Diallo, K., Loemba, H., Oliveira, M., Mavoungou, D.D., Wainberg, M.A., 2000. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) replication by immunor (IM28), a new analog of dehydroepiandrosterone. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 19, 2019-2024.
- Ebeling, P., Koivisto, V.A., 1994. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet* 343, 1479-1481.
- Endres, C.J., Moss, A.M., Ke, B., Govindarajan, R., Choi, D.S., Messing, R.O., Unadkat, J.D., 2009. The role of the equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in transport et metabolism of ribavirin by human et wild-type or Ent1-/- mouse erythrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 329, 387-398.
- Feld, J.J., Jacobson, I.M., Sulkowski, M.S., Poordad, F., Tatsch, F., Pawlotsky, J.M., 2017. Ribavirin revisited in the era of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Liver Int* 37, 5-18.
- Fernandez, H., Banks, G., Smith, R., 1986. Ribavirin: a clinical overview. *Eur J Epidemiol* 2, 1-14.
- Forest, M.G., 1978. Age-related response of plasma testosterone, delta 4-androstenedione, et cortisol to adrenocorticotropin in infants, children, et adults. *J Clin Endocrinol Metab* 47, 931-937.
- Fried, M.W., 2002. Side effects of therapy of hepatitis C et their management. *Hepatology* 36, S237-244.
- Fukuchi, Y., Furihata, T., Hashizume, M., Iikura, M., Chiba, K., 2010. Characterization of ribavirin uptake systems in human hepatocytes. *J Hepatol* 52, 486-492.
- Gallois-Montbrun, S., Chen, Y., Dutartre, H., Sophys, M., Morera, S., Guerreiro, C., Schneider, B., Mulard, L., Janin, J., Veron, M., Deville-Bonne, D., Canard, B., 2003. Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol Pharmacol* 63, 538-546.
- Gard, P., 2001. Melatonine et DHEA. Elsevier 37-64.
- Glue, P., 1999. The clinical pharmacology of ribavirin. *Semin Liver Dis* 19 Suppl 1, 17-24.
- Gordon, G., Mackow, M.C., Levy, H.R., 1995. On the mechanism of interaction of steroids with human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 318, 25-29.
- Gordon, G.B., Shantz, L.M., Talalay, P., 1987. Modulation of growth, differentiation et carcinogenesis by dehydroepiandrosterone. *Adv Enzyme Regul* 26, 355-382.
- Graci, J.D., Cameron, C.E., 2006. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* 16, 37-48.
- Guénard, H., 1996. Physiologie humaine. Pradel, Paris.
- H Jeulin, F.K., N Grancher, V Venard 2009. Quel avenir pour la ribavirine en dehors de l'hépatite C ? . *Virologie* 13(2), 83-92.
- Hadziyannis, S.J., Sette, H., Jr., Morgan, T.R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H., Jr., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P.J., Lin, A., Ackrill, A.M., 2004. Peginterferon-alpha2a et ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration et ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140, 346-355.

- Hamilton, N.M., Dawson, M., Fairweather, E.E., Hamilton, N.S., Hitchin, J.R., James, D.I., Jones, S.D., Jordan, A.M., Lyons, A.J., Small, H.F., Thomson, G.J., Waddell, I.D., Ogilvie, D.J., 2012. Novel steroid inhibitors of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *J Med Chem* 55, 4431-4445.
- Handala, L., Domange, B., Ouled-Haddou, H., Garcon, L., Nguyen-Khac, E., Helle, F., Bodeau, S., Duverlie, G., Brochot, E., 2017. DHEA prevents ribavirin-induced anemia via inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Antiviral Res* 146, 153-160.
- Herbert, J., 1995. The age of dehydroepiandrosterone. *Lancet* 345, 1193-1194.
- Hill, M., Duskova, M., Starka, L., 2015. Dehydroepiandrosterone, its metabolites et ion channels. *J Steroid Biochem Mol Biol* 145, 293-314.
- Hillen, T., Lun, A., Reischies, F.M., Borchelt, M., Steinhagen-Thiessen, E., Schaub, R.T., 2000. DHEA-S plasma levels et incidence of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 47, 161-163.
- Homma, M., Hosono, H., Hasegawa, Y., Kohda, Y., 2009. Morphological transformation et phosphatidylserine exposure in erythrocytes treated with ribavirin. *Biol Pharm Bull* 32, 1940-1942.
- Homma, M., Matsuzaki, Y., Inoue, Y., Shibata, M., Mitamura, K., Tanaka, N., Kohda, Y., 2004. Marked elevation of erythrocyte ribavirin levels in interferon et ribavirin-induced anemia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2, 337-339.
- Hsiao, C.C., 2006. Difference in pre- et post-treatment plasma DHEA levels were significantly et positively correlated with difference in pre- et post-treatment Hamilton depression scores following successful therapy for major depression. *Psychoneuroendocrinology* 31, 839-846.
- Hung, C.H., Lee, C.M., Lu, S.N., Wang, J.H., Chen, C.H., Hu, T.H., Kee, K.M., Chang, K.C., Tseng, P.L., Yen, Y.H., Changchien, C.S., 2006. Anemia associated with antiviral therapy in chronic hepatitis C: incidence, risk factors, et impact on treatment response. *Liver Int* 26, 1079-1086.
- Inoue, Y., Homma, M., Matsuzaki, Y., Shibata, M., Matsumura, T., Ito, T., Kohda, Y., 2006. Erythrocyte ribavirin concentration for assessing hemoglobin reduction in interferon et ribavirin combination therapy. *Hepatol Res* 34, 23-27.
- Jarvis, S.M., Thorn, J.A., Glue, P., 1998. Ribavirin uptake by human erythrocytes et the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (es)-nucleoside transporters. *Br J Pharmacol* 123, 1587-1592.
- Jayle, M.F., Malassis, D., Pinaud, H., 1959. [Excretion of dehydroepiandrosterone before et after the administration of ACTH in adrenal pathology]. *Acta Endocrinol (Copenh)* 31, 1-32.
- Jellinck, P.H., Croft, G., McEwen, B.S., Gottfried-Blackmore, A., Jones, G., Byford, V., Bulloch, K., 2005. Metabolism of dehydroepiandrosterone by rodent brain cell lines: relationship between 7-hydroxylation et aromatization. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93, 81-86.
- Jellinck, P.H., Kaufmann, M., Gottfried-Blackmore, A., McEwen, B.S., Jones, G., Bulloch, K., 2007. Selective conversion by microglia of dehydroepiandrosterone to 5-androstenediol-A steroid with inherent estrogenic properties. *J Steroid Biochem Mol Biol* 107, 156-162.
- Jiang, Y., Zhu, Y., Mu, Q., Luo, H., Zhi, Y., Shen, X., 2017. Oxymatrine provides protection against Coxsackievirus B3-induced myocarditis in BALB/c mice. *Antiviral Res* 141, 133-139.
- Jones, J.A., Nguyen, A., Straub, M., Leidich, R.B., Veech, R.L., Wolf, S., 1997. Use of DHEA in a patient with advanced prostate cancer: a case report et review. *Urology* 50, 784-788.
- Jones, M.E., 1980. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, et regulation of UMP biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 49, 253-279.
- Kakumu, S., Yoshioka, K., Wakita, T., Ishikawa, T., Takayanagi, M., Higashi, Y., 1993. Pilot study of ribavirin et interferon-beta for chronic hepatitis B. *Hepatology* 18, 258-263.

- Kalimi M, R.W., 1990. The Biologic Role of Dehydroepiandrosterone (DHEA), De Gruyter ed, New York.
- Kalimi M, R.W., 2000. Dehydroepiandrosterone : Biochemical, Physiological et Clinical Aspects, De Gruyter ed, New York.
- Kamar, N., Izopet, J., Tripon, S., Bismuth, M., Hillaire, S., Dumortier, J., Radenne, S., Coilly, A., Garrigue, V., D'Alteroche, L., Buchler, M., Couzi, L., Lebray, P., Dharancy, S., Minello, A., Hourmant, M., Roque-Afonso, A.M., Abravanel, F., Pol, S., Rostaing, L., Mallet, V., 2014. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med* 370, 1111-1120.
- Kamar, N., Rostaing, L., Abravanel, F., Garrouste, C., Lhomme, S., Esposito, L., Basse, G., Cointault, O., Ribes, D., Nogier, M.B., Alric, L., Peron, J.M., Izopet, J., 2010. Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 139, 1612-1618.
- Kentsis, A., Topisirovic, I., Culjkovic, B., Shao, L., Borden, K.L., 2004. Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18105-18110.
- Khakoo, S., Glue, P., Grellier, L., Wells, B., Bell, A., Dash, C., Murray-Lyon, I., Lypnyj, D., Flannery, B., Walters, K., Dusheiko, G.M., 1998. Ribavirin et interferon alfa-2b in chronic hepatitis C: assessment of possible pharmacokinetic et pharmacodynamic interactions. *Br J Clin Pharmacol* 46, 563-570.
- Kim, S.H., Lee, S.H., Lee, W.Y., Lee, J., Chung, B.C., Park, M.J., Choi, M.H., 2016. Serum levels of cholesterol, pregnenolone, DHEA, et their sulfate conjugates based on sex et pubertal stage in adolescents. *Clin Chim Acta* 461, 47-52.
- Kleinegris, M.C., Koek, G.H., Mast, K., Mestrom, E.H., Wolfs, J.L., Bevers, E.M., 2012. Ribavirin-induced externalization of phosphatidylserine in erythrocytes is predominantly caused by inhibition of aminophospholipid translocase activity. *Eur J Pharmacol* 693, 1-6.
- Klump, W.M., Bergmann, I., Muller, B.C., Ameis, D., Kandolf, R., 1990. Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J Virol* 64, 1573-1583.
- Krishnan, S.M., Dixit, N.M., 2009. Estimation of red blood cell lifespan from alveolar carbon monoxide measurements. *Transl Res* 154, 15-17.
- Kroboth, P.D., Amico, J.A., Stone, R.A., Folan, M., Frye, R.F., Kroboth, F.J., Bigos, K.L., Fabian, T.J., Linares, A.M., Pollock, B.G., Hakala, C., 2003. Influence of DHEA administration on 24-hour cortisol concentrations. *J Clin Psychopharmacol* 23, 96-99.
- Labrie, F., 1991. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 78, C113-118.
- Labrie, F., Belanger, A., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Cusan, L., Gomez, J.L., Candas, B., 1998. DHEA et the intracrine formation of androgens et estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids* 63, 322-328.
- Labrie, F., Belanger, A., Simard, J., Van, L.-T., Labrie, C., 1995. DHEA et peripheral androgen et estrogen formation: intracrinology. *Ann N Y Acad Sci* 774, 16-28.
- Labrie, F., Diamond, P., Cusan, L., Gomez, J.L., Belanger, A., Candas, B., 1997. Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, et endometrium in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3498-3505.
- Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., 2001. DHEA et its transformation into androgens et estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 22, 185-212.
- Laskin, O.L., Longstreth, J.A., Hart, C.C., Scavuzzo, D., Kalman, C.M., Connor, J.D., Roberts, R.B., 1987. Ribavirin disposition in high-risk patients for acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Pharmacol Ther* 41, 546-555.

- Lavallee, B., Provost, P.R., Belanger, A., 1996a. Formation of pregnenolone- et dehydroepiandrosterone-fatty acid esters by lecithin-cholesterol acyltransferase in human plasma high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1299, 306-312.
- Lavallee, B., Provost, P.R., Roy, R., Gauthier, M.C., Belanger, A., 1996b. Dehydroepiandrosterone-fatty acid esters in human plasma: formation, transport et delivery to steroid target tissues. *J Endocrinol* 150 Suppl, S119-124.
- Leowattana, W., 2004. DHEAS as a new diagnostic tool. *Clin Chim Acta* 341, 1-15.
- Lertora, J.J., Rege, A.B., Lacour, J.T., Ferencz, N., George, W.J., VanDyke, R.B., Agrawal, K.C., Hyslop, N.E., Jr., 1991. Pharmacokinetics et long-term tolerance to ribavirin in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Pharmacol Ther* 50, 442-449.
- Lin, C.C., Yeh, L.T., Vitarella, D., Hong, Z., 2003. Viramidine, a prodrug of ribavirin, shows better liver-targeting properties et safety profiles than ribavirin in animals. *Antivir Chem Chemother* 14, 145-152.
- Lindahl, K., Schvarcz, R., Bruchfeld, A., Stahle, L., 2004. Evidence that plasma concentration rather than dose per kilogram body weight predicts ribavirin-induced anaemia. *J Viral Hepat* 11, 84-87.
- Liu, D., Dillon, J.S., 2002. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J Biol Chem* 277, 21379-21388.
- Loria, R.M., Inge, T.H., Cook, S.S., Szakal, A.K., Regelson, W., 1988. Protection against acute lethal viral infections with the native steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J Med Virol* 26, 301-314.
- Maeda, Y., Kiribayashi, Y., Moriya, T., Maruhashi, A., Omoda, K., Funakoshi, S., Murakami, T., Takano, M., 2004. Dosage adjustment of ribavirin based on renal function in Japanese patients with chronic hepatitis C. *Ther Drug Monit* 26, 9-15.
- Mahrt, H., Schemmerer, M., Behrens, G., Leitzmann, M., Jilg, W., Wenzel, J.J., 2018. Continuous decline of hepatitis E virus seroprevalence in southern Germany despite increasing notifications, 2003-2015. *Emerg Microbes Infect* 7, 133.
- Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J.K., 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965.
- Marks, P.A., Banks, J., 1960. Inhibition of Mammalian Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by Steroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 46, 447-452.
- McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.H., Cort, S., Albrecht, J.K., 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339, 1485-1492.
- McNelis, J.C., Manolopoulos, K.N., Gathercole, L.L., Bujalska, I.J., Stewart, P.M., Tomlinson, J.W., Arlt, W., 2013. Dehydroepiandrosterone exerts antiglucocorticoid action on human preadipocyte proliferation, differentiation, et glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305, E1134-1144.
- Migeon, C.J., Plager, J.E., 1954. Identification et isolation of dehydroisoandrosterone from peripheral human plasma. *J Biol Chem* 209, 767-772.
- Mikeladze, M., Hedrington, M.S., Joy, N., Tate, D.B., Younk, L.M., Davis, I., Davis, S.N., 2016. Acute Effects of Oral Dehydroepiandrosterone on Counterregulatory Responses During Repeated Hypoglycemia in Healthy Humans. *Diabetes* 65, 3161-3170.
- Miller, K.K., Cai, J., Ripp, S.L., Pierce, W.M., Jr., Rushmore, T.H., Prough, R.A., 2004. Stereo- et regioselectivity account for the diversity of dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolites produced by liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 32, 305-313.
- Morales, A.J., Nolan, J.J., Nelson, J.C., Yen, S.S., 1994. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men et women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 1360-1367.

- Morohashi, K., Sogawa, K., Omura, T., Fujii-Kuriyama, Y., 1987. Gene structure of human cytochrome P-450(SCC), cholesterol desmolase. *J Biochem* 101, 879-887.
- Morsches, B., Benes, P., Holzmann, H., Henrich, B., 1981. [Penetration kinetics of dehydroepiandrosterone through the erythrocyte membrane (author's transl)]. *Arch Dermatol Res* 270, 49-55.
- Mortola, J.F., Yen, S.S., 1990. The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 71, 696-704.
- Muller, C., Cluzeaud, F., Pinon, G.M., Rafestin-Oblin, M.E., Morfin, R., 2004. Dehydroepiandrosterone et its 7-hydroxylated metabolites do not interfere with the transactivation et cellular trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, 469-476.
- Nakao, M., Nakao, T., Yamazoe, S., 1960. Adenosine triphosphate et maintenance of shape of the human red cells. *Nature* 187, 945-946.
- Nestler, J.E., 1997. Insulin regulation of human ovarian androgens. *Hum Reprod* 12 Suppl 1, 53-62.
- Nomura, H., Tanimoto, H., Kajiwar, E., Shimono, J., Maruyama, T., Yamashita, N., Nagano, M., Higashi, M., Mukai, T., Matsui, Y., Hayashi, J., Kashiwagi, S., Ishibashi, H., 2004. Factors contributing to ribavirin-induced anemia. *J Gastroenterol Hepatol* 19, 1312-1317.
- Okada, I., Matsumori, A., Matoba, Y., Tominaga, M., Yamada, T., Kawai, C., 1992. Combination treatment with ribavirin et interferon for coxsackievirus B3 replication. *J Lab Clin Med* 120, 569-573.
- Orentreich, N., Brind, J.L., Rizer, R.L., Vogelmann, J.H., 1984. Age changes et sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 59, 551-555.
- Orentreich, N., Brind, J.L., Vogelmann, J.H., Andres, R., Baldwin, H., 1992. Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 1002-1004.
- Paeshuysse, J., Dallmeier, K., Neyts, J., 2011. Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action. *Curr Opin Virol* 1, 590-598.
- Page, T., Connor, J.D., 1990. The metabolism of ribavirin in erythrocytes et nucleated cells. *Int J Biochem* 22, 379-383.
- Parker, C.R., Jr., Mixon, R.L., Brissie, R.M., Grizzle, W.E., 1997. Aging alters zonation in the adrenal cortex of men. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3898-3901.
- Peixoto, C., Carrilho, C.G., Barros, J.A., Ribeiro, T.T., Silva, L.M., Nardi, A.E., Cardoso, A., Veras, A.B., 2017. The effects of dehydroepiandrosterone on sexual function: a systematic review. *Climacteric* 20, 129-137.
- Pharmacopée, 2003. *Journal officiel* n°9 du 11 janvier 2003-Additif n°48.
- Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S.S., Niederau, C., Minuk, G.S., Ideo, G., Bain, V., Heathcote, J., Zeuzem, S., Trepo, C., Albrecht, J., 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). Lancet* 352, 1426-1432.
- Rabkin, J.G., McElhiney, M.C., Rabkin, R., McGrath, P.J., Ferrando, S.J., 2006. Placebo-controlled trial of dehydroepiandrosterone (DHEA) for treatment of nonmajor depression in patients with HIV/AIDS. *Am J Psychiatry* 163, 59-66.
- Reau, N., Hadziyannis, S.J., Messinger, D., Fried, M.W., Jensen, D.M., 2008. Early predictors of anemia in patients with hepatitis C genotype 1 treated with peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin. *Am J Gastroenterol* 103, 1981-1988.
- Reddy, K.R., Shiffman, M.L., Morgan, T.R., Zeuzem, S., Hadziyannis, S., Hamzeh, F.M., Wright, T.L., Fried, M., 2007. Impact of ribavirin dose reductions in hepatitis C virus genotype 1 patients completing peginterferon alfa-2a/ribavirin treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5, 124-129.

- Reed LJ, M.H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. . Am J Hyg. 27, 493-497.
- Richardson, B.A., Overbaugh, J., 2005. Basic statistical considerations in virological experiments. J Virol 79, 669-676.
- Romanutti, C., Bruttomesso, A.C., Castilla, V., Bisceglia, J.A., Galagovsky, L.R., Wachsman, M.B., 2009. *In vitro* antiviral activity of dehydroepiandrosterone et its synthetic derivatives against vesicular stomatitis virus. Vet J 182, 327-335.
- Rosenfeld, R.S., Hellman, L., Roffwarg, H., Weitzman, E.D., Fukushima, D.K., Gallagher, T.F., 1971. Dehydroisoandrosterone is secreted episodically et synchronously with cortisol by normal man. J Clin Endocrinol Metab 33, 87-92.
- Rotter, J.I., Wong, F.L., Lifrak, E.T., Parker, L.N., 1985. A genetic component to the variation of dehydroepiandrosterone sulfate. Metabolism 34, 731-736.
- Saito, H., Tada, S., Ebinuma, H., Ishii, H., Kashiwazaki, K., Takahashi, M., Tsukada, N., Nishida, J., Tanaka, S., Shiozaki, H., Hibi, T., 2006. Role of erythrocytes as a reservoir for ribavirin et relationship with adverse reactions in the early phase of interferon combination therapy for chronic hepatitis C virus infections. J Clin Microbiol 44, 3562-3568.
- Samaras, N., Samaras, D., Frangos, E., Forster, A., Philippe, J., 2013. A review of age-related dehydroepiandrosterone decline et its association with well-known geriatric syndromes: is treatment beneficial? Rejuvenation Res 16, 285-294.
- Sayed, I.M., Verhoye, L., Cocquerel, L., Abravanel, F., Foquet, L., Montpellier, C., Debing, Y., Farhoudi, A., Wychowski, C., Dubuisson, J., Leroux-Roels, G., Neyts, J., Izopet, J., Michiels, T., Meuleman, P., 2017. Study of hepatitis E virus infection of genotype 1 et 3 in mice with humanised liver. Gut 66, 920-929.
- Scherzer, T.M., Stattermayer, A.F., Stauber, R., Maieron, A., Strasser, M., Laferl, H., Schwarzer, R., Datz, C., Rutter, K., Beinhardt, S., Steindl-Munda, P., Hofer, H., Ferenci, P., 2013. Effect of gender et ITPA polymorphisms on ribavirin-induced anemia in chronic hepatitis C patients. J Hepatol 59, 964-971.
- Schiebinger, R.J., Albertson, B.D., Cassorla, F.G., Bowyer, D.W., Geelhoed, G.W., Cutler, G.B., Jr., Loriaux, D.L., 1981. The developmental changes in plasma adrenal androgens during infancy et adrenarche are associated with changing activities of adrenal microsomal 17-hydroxylase et 17,20-desmolase. J Clin Invest 67, 1177-1182.
- Schlienger, J.L., Perrin, A.E., Goichot, B., 2002. [DHEA: an unknown star]. Rev Med Interne 23, 436-446.
- Schopf, R.E., Muller, F.J., Benes, P., Morsches, B., 1986. Augmented glucose-6-phosphate dehydrogenase activity et normal penetration et metabolism of dehydroepiandrosterone in mononuclear leukocytes in psoriasis. Arch Dermatol Res 278, 393-397.
- 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.
- Smail, P.J., Faiman, C., Hobson, W.C., Fuller, G.B., Winter, J.S., 1982. Further studies on adrenarche in nonhuman primates. Endocrinology 111, 844-848.
- Smee, D.F., Bray, M., Huggins, J.W., 2001. Antiviral activity et mode of action studies of ribavirin et mycophenolic acid against orthopoxviruses in vitro. Antivir Chem Chemother 12, 327-335.
- Snoeck, E., Wade, J.R., Duff, F., Lamb, M., Jorga, K., 2006. Predicting sustained virological response et anaemia in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin. Br J Clin Pharmacol 62, 699-709.
- Starka, L., Duskova, M., Hill, M., 2015. Dehydroepiandrosterone: a neuroactive steroid. J Steroid Biochem Mol Biol 145, 254-260.
- Stickel, F., Helbling, B., Heim, M., Geier, A., Hirschi, C., Terziroli, B., Wehr, K., De Gottardi, A., Negro, F., Gerlach, T., 2012. Critical review of the use of erythropoietin in the treatment of anaemia during therapy for chronic hepatitis C. J Viral Hepat 19, 77-87.
- Sulkowski, M.S., Wasserman, R., Brooks, L., Ball, L., Gish, R., 2004. Changes in haemoglobin during interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat 11, 243-250.

- Symington, T., Duguid, W.P., Davidson, J.N., 1956. Effect of exogenous corticotropin on the histochemical pattern of the human adrenal cortex et a comparison with the changes during stress. *J Clin Endocrinol Metab* 16, 580-598.
- Tagliaferro, A.R., Roebuck, B.D., Ronan, A.M., Meeker, L.D., 1992. Enhancement of pancreatic carcinogenesis by dehydroepiandrosterone. *Adv Exp Med Biol* 322, 119-129.
- Tam, R.C., Ramasamy, K., Bard, J., Pai, B., Lim, C., Averett, D.R., 2000. The ribavirin analog ICN 17261 demonstrates reduced toxicity et antiviral effects with retention of both immunomodulatory activity et reduction of hepatitis-induced serum alanine aminotransferase levels. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1276-1283.
- Testoni, B., Durantel, D., Lebosse, F., Fresquet, J., Helle, F., Negro, F., Donato, M.F., Levrero, M., Zoulim, F., 2016. Ribavirin restores IFNalpha responsiveness in HCV-infected livers by epigenetic remodelling at interferon stimulated genes. *Gut* 65, 672-682.
- Thomas, E., Ghany, M.G., Liang, T.J., 2012. The application et mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother* 23, 1-12.
- Thompson, A.J., Fellay, J., Patel, K., Tillmann, H.L., Naggie, S., Ge, D., Urban, T.J., Shianna, K.V., Muir, A.J., Fried, M.W., Afdhal, N.H., Goldstein, D.B., McHutchison, J.G., 2010. Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia et decrease the need for ribavirin dose reduction. *Gastroenterology* 139, 1181-1189.
- Thorburn, D.R., Kuchel, P.W., 1985. Regulation of the human-erythrocyte hexose-monophosphate shunt under conditions of oxidative stress. A study using NMR spectroscopy, a kinetic isotope effect, a reconstituted system et computer simulation. *Eur J Biochem* 150, 371-386.
- Todt, D., Walter, S., Brown, R.J., Steinmann, E., 2016. Mutagenic Effects of Ribavirin on Hepatitis E Virus-Viral Extinction versus Selection of Fitness-Enhancing Mutations. *Viruses* 8.
- Torres, N.I., Castilla, V., Bruttomesso, A.C., Eiras, J., Galagovsky, L.R., Wachsman, M.B., 2012. *In vitro* antiviral activity of dehydroepiandrosterone, 17 synthetic analogs et ERK modulators against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res* 95, 37-48.
- van Soest, H., Renooij, W., van Erpecum, K.J., 2009. Clinical et basal aspects of anemia during antiviral therapy for hepatitis C. *Ann Hepatol* 8, 316-324.
- Van Vlierbergh, H., Delanghe, J.R., De Vos, M., Leroux-Roel, G., 2001. Factors influencing ribavirin-induced hemolysis. *J Hepatol* 34, 911-916.
- van Vollenhoven, R.F., 2002. Dehydroepiandrosterone for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Pharmacother* 3, 23-31.
- van Vollenhoven, R.F., Park, J.L., Genovese, M.C., West, J.P., McGuire, J.L., 1999. A double-blind, placebo-controlled, clinical trial of dehydroepiandrosterone in severe systemic lupus erythematosus. *Lupus* 8, 181-187.
- van Weerden, W.M., Bierings, H.G., van Steenbrugge, G.J., de Jong, F.H., Schroder, F.H., 1992. Adrenal glands of mouse et rat do not synthesize androgens. *Life Sci* 50, 857-861.
- Vermeulen, A., 1995. Dehydroepiandrosterone sulfate et aging. *Ann N Y Acad Sci* 774, 121-127.
- Villareal, D.T., Holloszy, J.O., 2004. Effect of DHEA on abdominal fat et insulin action in elderly women et men: a randomized controlled trial. *JAMA* 292, 2243-2248.
- Wade, J.R., Snoeck, E., Duff, F., Lamb, M., Jorga, K., 2006. Pharmacokinetics of ribavirin in patients with hepatitis C virus. *Br J Clin Pharmacol* 62, 710-714.
- Watson, J., 2002. Prospects for hepatitis C virus therapeutics: levovirin et virmidine as improved derivatives of ribavirin. *Curr Opin Investig Drugs* 3, 680-683.
- Welle, S., Jozefowicz, R., Statt, M., 1990. Failure of dehydroepiandrosterone to influence energy et protein metabolism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 71, 1259-1264.

Willis, R.C., Carson, D.A., Seegmiller, J.E., 1978. Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3042-3044.

Witkowski, J.T., Robins, R.K., Sidwell, R.W., Simon, L.N., 1972. Design, synthesis, et broad spectrum antiviral activity of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide et related nucleosides. *J Med Chem* 15, 1150-1154.

Wolf, O.T., Kirschbaum, C., 1999. Actions of dehydroepiandrosterone et its sulfate in the central nervous system: effects on cognition et emotion in animals et humans. *Brain Res Brain Res Rev* 30, 264-288.

Wolkowitz, O.M., Reus, V.I., Mellon, S.H., 2011. Of sound mind et body: depression, disease, et accelerated aging. *Dialogues Clin Neurosci* 13, 25-39.

Wu, J.Z., Larson, G., Hong, Z., 2004. Dual-action mechanism of viramidine functioning as a prodrug et as a catabolic inhibitor for ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4006-4008.

Wu, J.Z., Walker, H., Lau, J.Y., Hong, Z., 2003. Activation et deactivation of a broad-spectrum antiviral drug by a single enzyme: adenosine deaminase catalyzes two consecutive deamination reactions. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 426-431.

Young, J., Couzinet, B., Nahoul, K., Brailly, S., Chanson, P., Baulieu, E.E., Schaison, G., 1997. Panhypopituitarism as a model to study the metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2578-2585.

Young J., C.P., Scaison G, 2001. DHEA: pilule de jeunesse ou simple précurseur des stéroïdes sexuels. *Med. Ther. Endocr* 37, 133-142.

Zwain, I.H., Yen, S.S., 1999. Dehydroepiandrosterone: biosynthesis et metabolism in the brain. *Endocrinology* 140, 880-887.

Rapport sur la DHEA, Groupe ad hoc du 03 juillet 2001, AFSSAPS

VIII. ANNEXE



DHEA prevents ribavirin-induced anemia via inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase



Lynda Handala^a, Barbara Domange^a, Hakim Ouled-Haddou^b, Loïc Garçon^b,
Eric Nguyen-Khac^c, Francois Helle^a, Sandra Bodeau^d, Gilles Duverlie^a,
Etienne Brochot^{a,*}

^a Laboratoire de Virologie EA4294, Université de Picardie Jules Verne, Centre Hospitalier Universitaire, 80054, Amiens, France

^b Laboratoire d'Hématologie EA4666, Université de Picardie Jules Verne, Centre Hospitalier Universitaire, 80054, Amiens, France

^c Service d'Hépatogastroentérologie, ERI24, Centre Hospitalier Universitaire, 80054, Amiens, France

^d Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, U1088, Centre Hospitalier Universitaire, 80054, Amiens, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2017

Received in revised form

22 August 2017

Accepted 1 September 2017

Available online 8 September 2017

Keywords:

DHEA

Ribavirin

Anemia

Hemolysis

Glycolysis

ABSTRACT

Ribavirin has been widely used for antiviral therapy. Unfortunately, ribavirin-induced anemia is often a cause of limiting or interrupting treatment. Our team has observed that dehydroepiandrosterone (DHEA) has a protective effect against *in vitro* and *in vivo* ribavirin-induced hemolysis. The aim of this study was to better understand this effect as well as the underlying mechanism(s).

DHEA was able to reduce *in vitro* intraerythrocytic ATP depletion induced by ribavirin. Only 1% of ATP remained after incubation with ribavirin (2 mM) at 37 °C for 24 h vs. 37% if DHEA (200 μM) was added ($p < 0.01$). DHEA also helped erythrocytes conserve their size, with a shrinkage of only 10% vs 40% at 24 h with ribavirin alone ($p < 0.01$), and reduced phosphatidylserine exposure at the outer membrane, i.e. 27% vs 40% at 48 h, ($p < 0.05$). DHEA also inhibits ribavirin-induced hemolysis, i.e. 34% vs 46.5% at 72 h ($p < 0.01$).

DHEA is an inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), a key enzyme in the hexose monophosphate shunt connected to the glycolytic pathway which is the only energy supplier of the red blood cell in the form of ATP. We have confirmed this inhibitory effect in the presence of ribavirin. All these observations suggest that ribavirin-induced hemolysis was initiated by ATP depletion, and that the inhibitory effect of DHEA on G6PD was able to rescue enough ATP to limit this hemolysis. This mechanism could be important for improving the therapeutic management of patients treated with ribavirin.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ribavirin (RBV) is a synthetic purine nucleoside analog with a broad antiviral spectrum. RBV has been used to treat numerous viral infections mainly due to the respiratory syncytial virus, some hemorrhagic fever viruses, hepatitis C, and hepatitis E viruses (Beaucourt and Vignuzzi, 2014). RBV appears to be a pleiotropic agent, and several antiviral mechanisms may act together, depending on the type of viral infection (Graci and Cameron, 2006; Paeshuysse et al., 2011). Ribavirin monophosphate (RMP) inhibits inosine 5'-monophosphate

dehydrogenase (IMPDH). Ribavirin triphosphate (RTP) may inhibit viral RNA-dependent polymerases (RdRp) and/or viral capping as it is recognized by guanylyltransferase. Alternatively, RTP can be incorporated into nascent RNA leading to viral mutagenesis. Additionally, some immunomodulatory effects have been attributed to RBV and synergistic effects with interferons have been described in interferon-stimulated gene (ISG) expression with epigenetic remodeling (Brochot et al., 2007; Testoni et al., 2016). However, RBV is associated with many treatment-limiting adverse effects, the most frequent and severe being reversible hemolytic anemia (Brochot et al., 2010; Feld et al., 2017). In a recent study reporting the treatment of chronic hepatitis E in transplant recipients, 54% of the patients required erythropoietin and 12% received a blood transfusion (Kamar et al., 2014). Since the antiviral effect of RBV is dose-dependent, the monitoring of ribavirin-induced anemia is important in improving the

* Corresponding author. Laboratoire de Virologie EA4294, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université de Picardie Jules Verne, Centre Hospitalier Universitaire, 80054 Amiens Cx1, France.

E-mail address: etienne.brochot@u-picardie.fr (E. Brochot).

success-rate (Loustaud-Ratti et al., 2016). Polymorphisms of ENT and ITPA encoding genes have been used to predict RBV-induced anemia (Ampuero and Romero-Gomez, 2016; Wu et al., 2016). A moderate central effect of ribavirin has been described in bone marrow, but the severe effect relies on a peripheral and direct effect on red blood cells, inducing mainly extravascular and sometimes intravascular hemolysis with a decrease in haptoglobin (Ronconi et al., 2014).

The human equilibrative nucleoside transporter ENT1 transports ribavirin into erythrocytes, where it is phosphorylated into RMP, RDP, and RTP which accumulates in the red blood cell devoid of dephosphorylating enzymes (Endres et al., 2009). This rapid accumulation leads to a substantial depletion of ATP and induces a higher susceptibility to oxidative membrane damage (De Franceschi et al., 2000) or phosphatidylserine externalization (Homma et al., 2009; Kleinegris et al., 2012). Both mechanisms may result in extravascular erythrophagocytosis, and consequently ribavirin-induced anemia.

The team of Peter Ferenci has observed that premenopausal females are less likely to develop ribavirin-induced anemia (Scherzer et al., 2013), and we have used an *in vitro* assay to demonstrate that the level of dehydroepiandrosterone (DHEA) can reduce ribavirin-induced hemolysis (Brochot et al., 2012, 2014). Recently, our group confirmed this result *in vivo* in 108 patients chronically infected with hepatitis C treated with a ribavirin-based combination (Bodeau et al., 2016). Serum baseline DHEA levels were closely related to the hemoglobin drop at week 12 of treatment ($p = 0.002$). DHEA, a steroid of adrenal origin, also has multiple effects and has been described in numerous studies as a non competitive inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) exerting its effect by binding to the enzyme-substrate complex (Gordon et al., 1995; Marks and Banks, 1960). G6PD is a key enzyme in the pentose phosphate pathway (PPP), also called the hexose monophosphate shunt (HMS), which plays an important role in the human erythrocyte for which glycolysis is the only energy currency supplier in the form of ATP. In this study we therefore explored whether this mechanism could explain all or part of the inhibitory effect of DHEA on ribavirin-induced hemolysis.

These results could be important in optimizing ribavirin-based therapies. DHEA daily oral supplementation at a dose of 50 mg has been widely tested in many studies to keep the DHEA levels in young adults around 10 μM . Moreover, some clinical studies have been performed at a daily oral dose of 1600 mg of DHEA up to one month without important side effects (Welle S. et al., 1990; Mortola and Yen, 1990; Mikeladze M. et al., 2016). Thus, the principal interest in using DHEA would be to increase the dose of ribavirin to obtain more performing antiviral activity and by the same time, to limit its major side effect.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ribavirin, DHEA, ionomycin, and maleimide were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France).

2.2. Sample collection and isolation of erythrocytes

Human blood was obtained from healthy volunteers ($n = 5$) by venipuncture and collected in citrate 3.2% acting as an anticoagulant. After removal of plasma and buffy coat by centrifugation at 1,000g, red blood cells (RBCs) were washed three times with HEPES buffer at pH 7.4 (10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 5 mM glucose) at room temperature, and subsequently centrifuged at 1,000g for 5min. Washed cells were suspended in HEPES buffer at a concentration of 1.10^8 cells/mL in the presence of

50U/mL penicillin-G and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. The cells were tested the same day.

2.3. Ribavirin and DHEA treatment of erythrocytes

Ribavirin was prepared in HEPES buffer at a concentration of 40 mM and diluted in the different samples to the desired final concentration. DHEA was solubilized in ethanol at a concentration of 40 mM. Erythrocytes at 10^8 cells/mL in 2 mL HEPES buffer were incubated for one to three days at 37 °C and gently mixed (60 rpm) with increasing concentrations of ribavirin (10, 20, 50, 100, 300, 500 μM , 1 mM, or 2 mM) or increasing concentrations of DHEA (10, 20, 50, 100, or 200 μM). Co-incubation experiments were also performed combining ribavirin and DHEA to compare the effect of each compound with their association.

2.4. Measurement of ATP content of red blood cells

Treated and untreated RBCs were diluted (1/10) in 100 μL of PBS and assayed for ATP using the cell titer-Glo assay (Promega, France) according to the manufacturer's instructions. Relative luminescence units (RLU) were set at 100% of ATP content for freshly obtained erythrocytes.

2.5. Measurement of size and phosphatidylserine exposure of erythrocytes

Treated and untreated RBCs were diluted and stained with 3 μL of Annexin V-FITC (BD Biosciences) for 15 min at 4 °C, following the recommendations of the manufacturer. The positive control was obtained using 3 μL of ionomycin diluted in ethanol to a final concentration of 30 μM . Data were analyzed for 10 000 events per aliquot using the MACSQuant Flow Cytometer (Miltenyi Biotec). The forward light scatter channels (FSCs) were used to estimate RBC size, which is the principal component of the FSC signal.

2.6. Measurement of ribavirin-induced hemolysis

After 72 h of incubation at 37 °C with each drug or their combination, RBCs were eliminated by centrifugation, and hemoglobin was measured in the supernatant by spectrophotometry at 540 nm, as previously reported. The percentage of hemolysis was calculated by comparison with RBCs suspended in distilled water which results in 100% hemolysis (Brochot et al., 2012).

2.7. Glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition assay

During the treatment of erythrocytes by DHEA and ribavirin described above, we evaluated the inhibition of G6PD by DHEA at 30min and 3 h by dosing the production of NADPH at 340 nm (Beutler et al., 1977). A standard commercial assay was used (Biolabo, France). Maleimide 12 mM was added to inhibit further production of NADPH by 6-phosphogluconate dehydrogenase (Deutsch, 1978). Linear changes in absorbance at 340 nm were recorded at 1min intervals for 30min (Sunrise microplate reader; Tecan, Switzerland). The rate of NADPH production was normalized to the quantity of hemoglobin measured at 540 nm in each sample. The percentage of inhibition was calculated in comparison with the G6PD control without DHEA and ribavirin measured at the same time.

2.8. Virus yield reduction assay due to ribavirin alone or in combination with DHEA

Antiviral effects of ribavirin 2 mM alone or associated with

DHEA 200 μ M were evaluated and compared using a virus yield reduction assay. The Nancy strain of Coxsackievirus B3 (CVB3) was obtained from pCB3 Nancy infectious cDNA plasmid (Klump et al., 1990) and was grown on HeLa cells with DMEM containing 10% fetal calf serum. CVB3 was used to infect triplicate HeLa cells in 96-well plates with 10-fold serial dilutions of virus-containing supernatants (Jiang et al., 2017). The presence of the typical enteroviral cytopathic effects of CVB3 was monitored in all wells for 4d (96 h). From these data, the 50% cell culture infective dose ($ccid_{50}/mL$) was calculated using the Reed and Muench formula. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test using the log values of the viral titers (Richardson and Overbaugh, 2005). A *p*-value <0.05 was considered significant.

2.9. Statistical analysis

Unless otherwise specified, statistical analysis was performed using quantitative results of triplicate assays and these were analyzed using Student's *t*-test. A *p*-value <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Rapid and severe depletion of intracellular ATP by ribavirin

The relative quantification of intracellular ATP after incubation with 10, 20, 50, 100, 300, 500 μ M, 1 mM, or 2 mM of ribavirin is shown in Fig. 1A. Fresh erythrocytes were considered as having a content of 100% ATP at *t*₀ immediately after blood sampling. A spontaneous decrease in ATP appeared in control red blood cells, but ribavirin triggered a highly significant proportional decrease at 24 h and 48 h. At 24 h, only $77 \pm 5.0\%$, $60 \pm 8.2\%$, $43 \pm 2.9\%$, $30 \pm 3.0\%$, and $14 \pm 1.3\%$, of intracellular ATP remained in the respective concentrations compared to the control at the same time of measurement ($p < 0.0001$). At 48 h, only $24 \pm 2.4\%$, $11 \pm 3\%$, $4 \pm 0.6\%$, and $1 \pm 0.1\%$ of ATP remained at 10, 20, 50, and 100 μ M compared to the control at the same time of measurement ($p < 0.0001$), respectively, and almost no ATP was present in the sample containing 300 μ M of ribavirin.

3.2. DHEA limits the spontaneous decrease in ATP

The relative quantification of intracellular ATP after incubation with 10, 20, 50, 100, or 200 μ M of DHEA is shown in Fig. 1B. Interestingly, DHEA was able to prevent the spontaneous decrease in ATP over time in red blood cells. At 24 h, compared to the control at the same time, the content of ATP was significantly higher, i.e. from 115 to 125% ($p < 0.05$). This difference was even greater at 48 h, and the ATP content was 1.8 ± 0.13 , 1.9 ± 0.08 , 2.2 ± 0.16 , 2.3 ± 0.13 , and 2.4 ± 0.12 times higher than the control value at the same time, respectively ($p < 0.0001$).

3.3. DHEA rescues severe ATP depletion induced by ribavirin

Intracellular ATP was quantified in parallel after incubation of the erythrocytes with ribavirin 2 mM and with or without DHEA 200 μ M. The results of the relative quantification are shown in Fig. 1C. As already observed, the presence of ribavirin 2 mM induced a severe depletion of at least 99% of the ATP content in less than 24 h. The addition of DHEA at 200 μ M rescued a significant amount of ATP from depletion. At 24 h, $33 \pm 11.7\%$ of ATP was still present vs $0.58 \pm 0.15\%$ for the samples with ribavirin 2 mM at the same time ($p < 0.001$). At 48 h, $3.7 \pm 2.3\%$ of ATP was still present vs $0.09 \pm 0.01\%$ for the samples with ribavirin 2 mM at the same time ($p < 0.05$). However, the values obtained with ribavirin and DHEA

remained lower than the control values at the same time ($p < 0.05$).

3.4. DHEA rescues ribavirin-induced shrinkage of erythrocytes

Erythrocyte size was evaluated by the forward scatter channel (FSC) of the cytometer as shown in Fig. 2A. A significant amount of ribavirin-induced cell shrinkage was observed at 24 h and 48 h, i.e. $62 \pm 2.1\%$ ($p < 0.001$) and $65 \pm 1.8\%$ ($p = 0.001$), respectively. This shrinkage was reduced by the addition of DHEA 200 μ M to ribavirin, i.e. $93 \pm 8\%$ and $78 \pm 4.3\%$ at 24 h and 48 h, respectively ($p < 0.001$ and $p < 0.01$). The size of the red blood cells, but not their completely normal morphology (see supplementary data), was normalized by DHEA and not statistically different from the control red blood cells.

3.5. DHEA reduces the phosphatidylserine exposure induced by ribavirin

Erythrocytes in HEPES buffer were incubated for 24 h or 48 h with ribavirin 2 mM with and without DHEA 200 μ M. Phosphatidylserine exposure at the outer membrane of the red blood cells was measured using fluorescent-labeled annexin V. Ribavirin increased the percentage of annexin A5 positive cells to $11 \pm 3.2\%$ at 24 h (n.s.) and $37 \pm 7.1\%$ at 48 h ($p < 0.01$) as shown in Fig. 2B. Addition of DHEA 200 μ M resulted in a significantly lower exposure than with ribavirin alone, i.e. $25 \pm 7\%$ at 48 h ($p < 0.05$).

3.6. DHEA reduces ribavirin-induced hemolysis

Ribavirin-induced hemolysis was evaluated by measuring the release of hemoglobin in the supernatant using spectrophotometry at 540 nm and is shown in Fig. 3. After 72 h of treatment, hemolysis induced by ribavirin 2 mM reached $47 \pm 3.3\%$ vs $35 \pm 2.3\%$ when DHEA 200 μ M was added to ribavirin ($p < 0.01$). Hemolysis found with the combination of DHEA and ribavirin remained significantly higher compared to the control ($p < 0.05$).

3.7. DHEA inhibits intraerythrocytic G6PD in the presence of ribavirin

The inhibition of G6PD was measured after 30min and 3 h at 37 °C in red blood cells treated with DHEA at increasing doses in the presence or not of ribavirin, results are shown in Fig. 4. At 30min, inhibition of G6PD was $2.88 \pm 1.6\%$, $9.62 \pm 2.7\%$, $11.10 \pm 0.8\%$, and $16.50 \pm 1.5\%$ without ribavirin vs $1.92 \pm 1.1\%$, $8.19 \pm 1.9\%$, $12.8 \pm 2.8\%$, and $17.3 \pm 2.6\%$ with ribavirin (2 mM) at doses of 10, 50, 100, and 200 μ M of DHEA, respectively. This inhibition was significant for all the conditions compared to the control ($p < 0.01$). No significant difference was found between the values with and without ribavirin. At 3 h, inhibition of G6PD was $4.93 \pm 1.7\%$, $11.73 \pm 2.2\%$, $15.84 \pm 1.5\%$, and $19.37 \pm 3.7\%$ without ribavirin vs $9.56 \pm 0.9\%$, $17.03 \pm 2.0\%$, $18.83 \pm 2.5\%$, and $21.24 \pm 3.4\%$. This inhibition was significant for all the conditions, compared to the control at the same time ($p < 0.01$). Significantly different results were calculated between the values without and with ribavirin at 10 μ M and 50 μ M of DHEA.

3.8. DHEA does not significantly change the antiviral effect of ribavirin

The microtiter viral yield reduction assay confirmed the antiviral effect of ribavirin 2 mM against the Nancy strain of Coxsackievirus B3 (6.3 ± 0.5 log vs 8.5 ± 0.4 in the control supernatant; $p < 0.0001$). DHEA 200 μ M was also tested and had a significant effect on the viral titer (7.6 ± 0.5 log; $p < 0.001$) and the combination of ribavirin

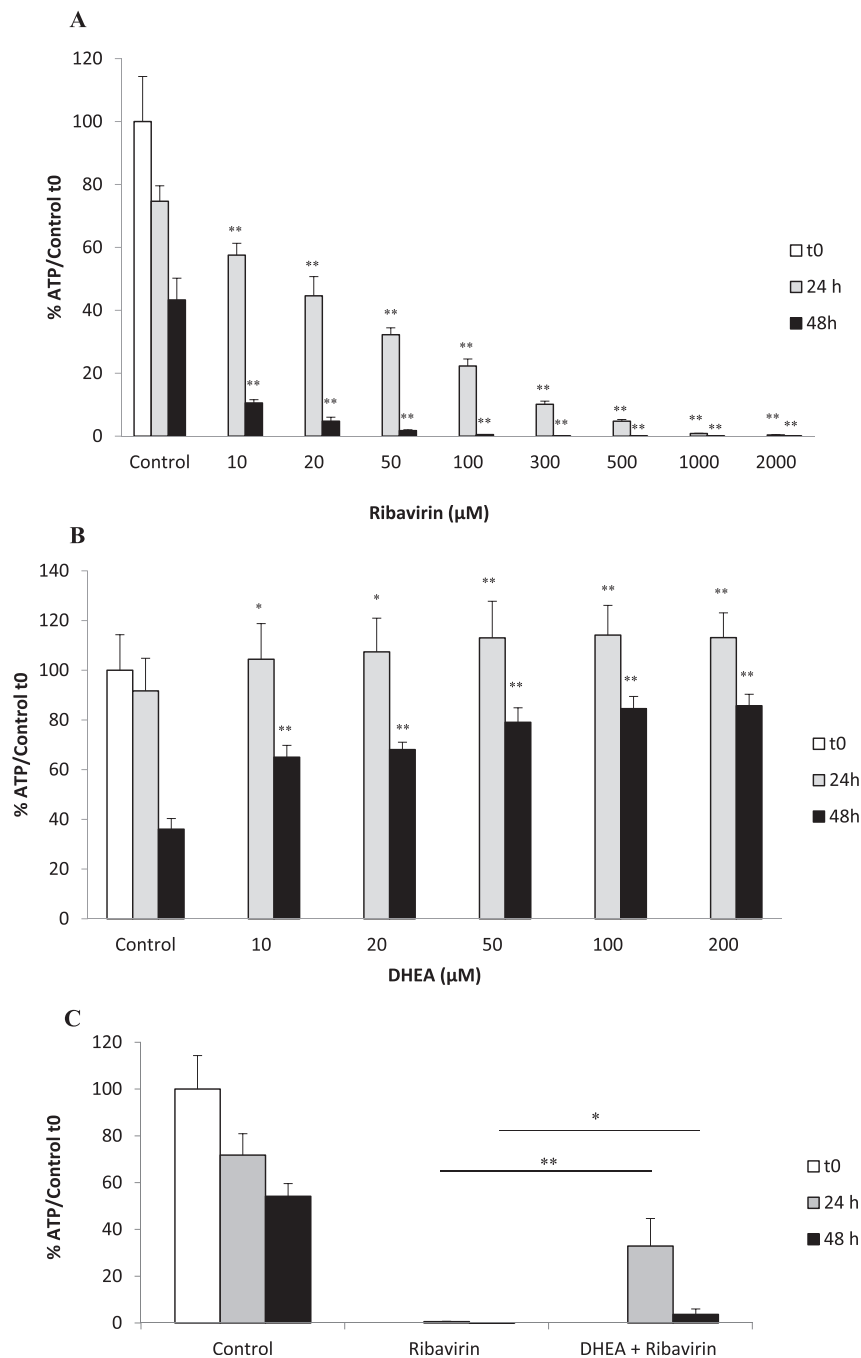


Fig. 1. Effect of ribavirin, DHEA, and a combination of both compounds on the ATP content of red blood cells. (A) Increasing concentrations of ribavirin from 10 μM to 2 mM incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ with human red blood cells. Relative amount of ATP was measured by bioluminescence at 24 h and 48 h. Fresh erythrocytes were considered as having a content of 100% ATP at t0 immediately after the blood sampling. A proportional decrease in ATP was significantly higher from ribavirin 10 μM compared to the control value at 24 h and 48 h; (** $p < 0.0001$). (B) Effect of DHEA in the same conditions. The ATP content was significantly higher from DHEA 10 μM at 24 h and 48 h; (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.0001$, respectively). (C) Effect of combining ribavirin 2 mM and DHEA 200 μM in the same conditions. The ATP content is significantly higher with DHEA and ribavirin compared to ribavirin alone at 24 h and 48 h; (** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, respectively). The graphs represent the means \pm standard deviation of 5 independent biological replicates.

and DHEA as well ($6.4 \pm 0.6 \log$; $p < 0.0001$). However, the effect of the combination of ribavirin with DHEA was not statistically different from ribavirin alone as shown in Fig. 5.

4. Discussion

Ribavirin entry and phosphorylation leads to an accumulation of RMP, RDP, and RTP in red blood cells between 0.8 and 1.6 mM because they lack the enzymes necessary for dephosphorylation

(Inoue et al., 2006). This accumulation leads in turn to ATP depletion since adenosine kinase is the main enzyme used for the phosphorylation of ribavirin (Page and Connor, 1990). Previous observations have been confirmed in this study under our experimental conditions (De Franceschi et al., 2000; Homma et al., 2009; Kleinegris et al., 2012). ATP is rapidly depleted from a ribavirin concentration of 10 μM (Fig. 1A), which corresponds to the therapeutic level of ribavirin described for HCV patients (van Soest et al., 2009). Ribavirin-induced shrinkage of red blood cells (Fig. 2A) and

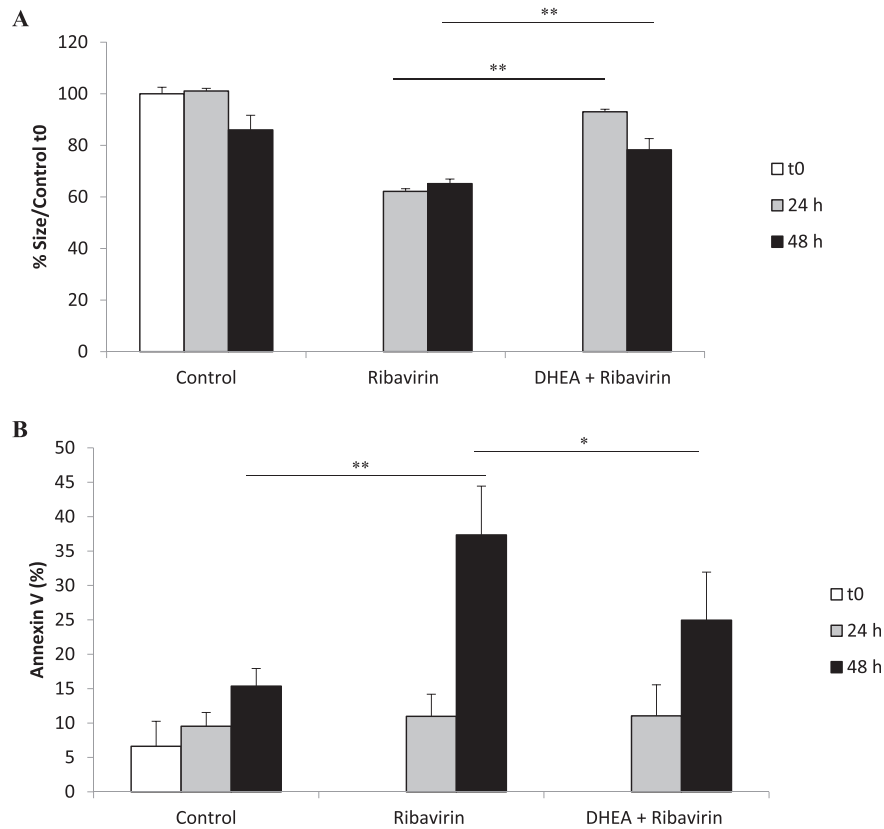


Fig. 2. Shrinkage and phosphatidylserine exposure in human erythrocytes treated with ribavirin 2 mM alone or combined with DHEA 200 μ M. (A) Ribavirin induced significant erythrocyte shrinkage ($p < 0.001$) and in addition of DHEA significantly limited this shrinkage at 24 h and 48 h ($**p < 0.001$ and $**p < 0.01$, respectively). (B) Ribavirin induced significant phosphatidylserine exposure at the outer membrane of red blood cells at 48 h ($**p < 0.001$) and the combination with DHEA significantly reduced this effect ($*p < 0.05$). The graphs represent the means \pm standard deviation of 5 independent biological replicates.

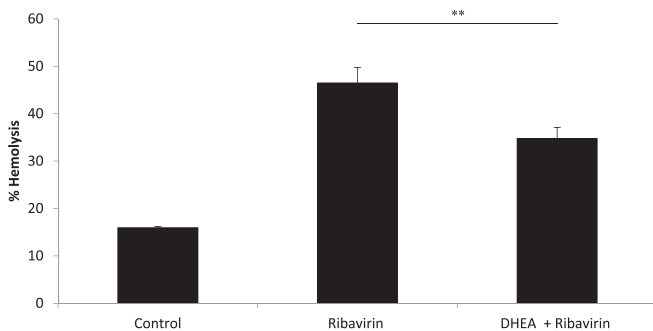


Fig. 3. Hemolysis of RBCs induced by ribavirin is reduced when RBCs are also treated with DHEA ($**p < 0.01$). Controls showed the spontaneous hemolysis of the RBCs after 72 h of incubation at 37 $^{\circ}$ C. The graphs represent the means \pm standard deviation of 5 independent biological replicates.

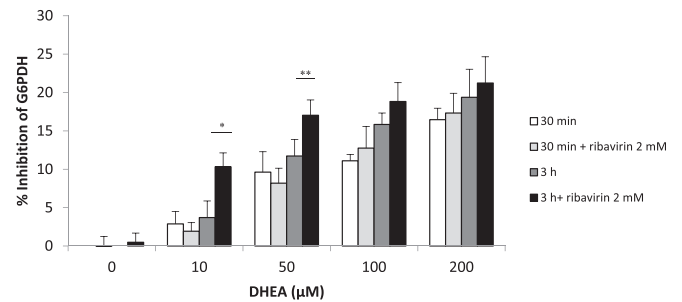


Fig. 4. Inhibition of intraerythrocytic G6PD by DHEA in the presence of ribavirin. G6PD inhibition was measured at 30min and 3 h at 37 $^{\circ}$ C in red blood cells treated with ribavirin 2 mM and DHEA 0, 10, 50, 100, and 200 μ M, respectively and was significant compared to the control at the same time ($p < 0.01$). Inhibition of G6PD from $4.9 \pm 1.7\%$ to $19.4 \pm 3.7\%$ was dependent on the DHEA dose from 10 μ M to 200 μ M, respectively and was significant compared to the control at the same time ($p < 0.01$). Addition of ribavirin increased the inhibition of G6PD from $9.56 \pm 0.9\%$ to $21.2 \pm 3.4\%$. This increase was significant for the DHEA doses of 10 μ M and 50 μ M ($*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, respectively). The graphs represent the means \pm standard deviation of 5 independent biological replicates.

phosphatidylserine exposure at the outer membrane (Fig. 2B) were also observed at 24 h and 48 h after incubation at 37 $^{\circ}$ C. At 72 h Fig. 6, ribavirin 2 mM induced significant hemolysis (Brochot et al., 2012). ATP deficiency may cause impairment of glycolysis which is the only energy supplier of the erythrocyte. This glycolysis and energy crisis is probably the initial cause of ribavirin-induced anemia because the red blood cell membrane integrity needs ATP-dependent enzymes such as aminophospholipid translocase (Kleinegris et al., 2012) as well as protection from oxidative damage occurring through the pentose phosphate pathway (PPP). The PPP is also called the hexose monophosphate shunt (HMS), as it is connected to the glycolytic pathway (De Franceschi et al., 2000).

Clinical and *in vitro* hemolysis studies led us to correlate the level of DHEA with a significant protective effect against ribavirin-induced anemia (Bodeau et al., 2016; Brochot et al., 2014; Scherzer et al., 2013). Hence, we were interested in investigating the mechanism(s) by which DHEA may act on RBCs. The protective effect of DHEA on the ATP content of red blood cells is shown in Fig. 2A from 10 μ M to 200 μ M since a significantly higher level of ATP content has been found when compared to the control red

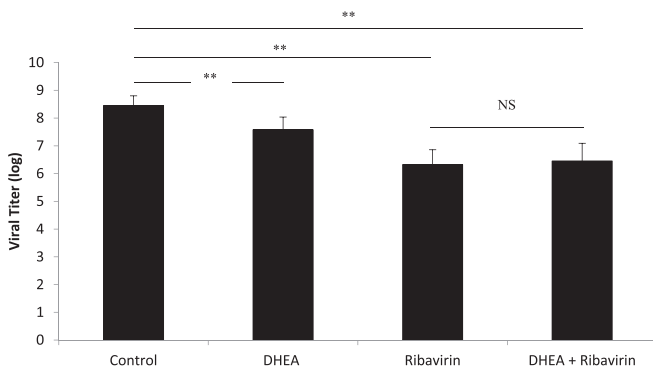


Fig. 5. A microtiter viral yield reduction assay was performed to confirm the antiviral effect of ribavirin 2 mM against the Nancy strain of Coxsackievirus B3. DHEA 200 μ M was tested as well as the combination of ribavirin and DHEA (** $p < 0.01$). The control is the measure of the viral titer of the CVB3 supernatant used for the assay. NS indicates no significant difference between the viral titer with ribavirin 2 mM alone or in association with DHEA 200 μ M. The graphs represent the means \pm standard deviation of 5 independent biological replicates.

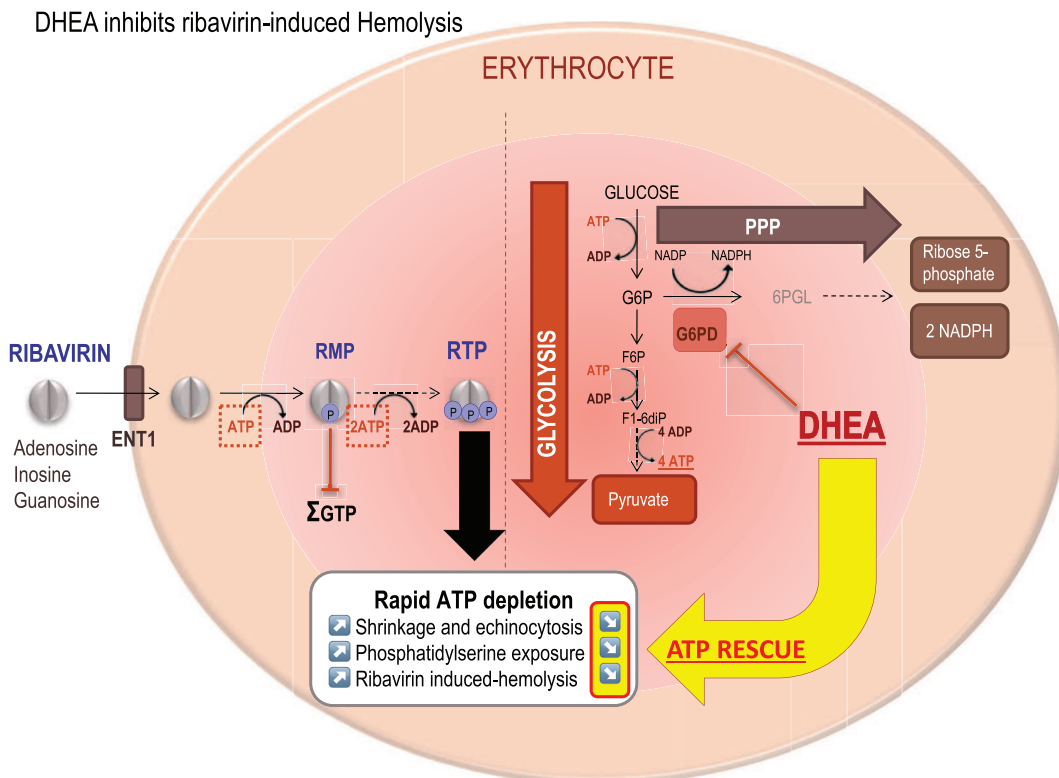
blood cells. Further experiments at 48 h–72 h were done with high doses of ribavirin (2 mM) and DHEA (200 μ M) to rapidly obtain an intraerythrocytic concentration of ribavirin comparable to the steady-state of a standard ribavirin-based therapy (0.8–1.6 mM) and to achieve significant penetration of DHEA (Morsches et al., 1981; Schopf et al., 1986). Except for the hemolysis study shown in Fig. 3, we do not report our data at 72 h because the significant hemolysis observed biased the data for the measurement of other parameters.

The results show that addition of DHEA significantly reduced the shrinkage of RBCs at 24 h and 48 h (Fig. 4), the phosphatidylserine exposure induced by ribavirin at 48 h, and ribavirin-

induced hemolysis at 72 h as previously reported (Brochet et al., 2014).

The combination of DHEA with ribavirin did not significantly change the antiviral effect of ribavirin. A significant antiviral effect of DHEA alone has already been reported *in vitro* against several viruses and an additional or synergistic effect of DHEA combined with ribavirin could have been expected (Torres et al., 2012). However, in the clinical context of ribavirin-based HCV therapy, no significant correlation has been found between the endogenous DHEA level and response to treatment.

As DHEA has been described as an inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase in many studies (Marks and Banks, 1960; Tian et al., 1998), it could be hypothesized that the inhibition of the pentose-phosphate pathway is sufficient to rescue enough ATP to prevent or limit ribavirin-induced anemia. As shown in Fig. 4, we have confirmed the rapid penetration of DHEA into red blood cells, as already reported (Morsches et al., 1981) and the significant inhibition of G6PD by DHEA in the presence or absence of ribavirin (Fig. 4). None or very little inhibition was found with ribavirin alone while, as expected, the inhibition of DHEA was dose-dependent, i.e. around 5% at 10 μ M of DHEA to around 20% at 200 μ M of DHEA. Surprisingly, the association of DHEA with ribavirin (2 mM) enhanced this inhibition, which is significant at 10 μ M and 50 μ M of DHEA ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively). No simple explanation can be given for this enhancement, but the inhibition of G6PD by DHEA needs the formation of a ternary complex, i.e. NADP^+ , glucose-6-phosphate, and the enzyme (Gordon et al., 1995). The relative concentration of substrates and enzyme may change in the presence of ribavirin and could explain the differences observed for G6PD inhibition. Whether or not this enhancement of G6PD inhibition by ribavirin may contribute to the ATP rescue requires further experiments because of the competition between ribavirin and adenosine for the same phosphorylating enzymes



Scheme 1.

(Page and Connor, 1990).

Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) concentration is highest in young females and men 18–29 years of age, i.e. 1.19–9.00 μM and 2.41–12.38 μM , respectively. Mean values then decline steadily in both sexes with some individual variability. DHEA-S is the circulating and storage form of DHEA, and a balance exists between both forms. DHEA-S was tested in parallel with DHEA in our experiments, and very similar results have been obtained (data not shown). In this study, a DHEA level of 10 μM is already able to significantly rescue the ATP content of red blood cells *in vitro* (Fig. 2A). Biochemical studies with the purified enzyme have shown that 1 μM of DHEA was able to inhibit about 30% of the G6PD activity (Marks and Banks, 1960). In normal and unstressed conditions, only 5–10% of the total glucose consumption passes through the hexose monophosphate shunt initiated by G6PD which operates at less than 1% of its capacity (Thorburn and Kuchel, 1985). In these conditions, a low level of DHEA and thus a partial inhibition of G6PD could be sufficient to preserve the ATP level in red blood cells, which should still be able to resist oxidative stress via the inducible HMS. The results obtained in this study favored the hypothesis of ATP depletion as the initial and most important factor in ribavirin-induced anemia. In pathological conditions, G6PD inhibition by a sufficient level of DHEA should be able to rescue enough ATP to prevent or limit this anemia.

This study has shown that the achievement of a physiological level of DHEA during a ribavirin-based treatment could be sufficient to rescue a significant percentage of ATP and could explain the clinical impact of endogenous DHEA in preventing ribavirin-induced anemia. In a previous clinical study, the cut-off for predicting a significant ribavirin-induced anemia of below 11 g/dL of hemoglobin, was found to be less than 1500 ng/mL of DHEA-S, i.e. 3.9 μM (Bodeau et al., 2016). If necessary, this physiological level can be easily reached with a standard low oral DHEA supplementation of 25–50 mg/day (Leowattana, 2004).

Thus, the combination of ribavirin with a low dose of DHEA could be a useful and inexpensive strategy for patients with low levels of high endogenous DHEA-S, without the need to lower or stop ribavirin treatment because of a drop in hemoglobin level. Moreover, the *in vitro* experiments suggest that a higher dose of ribavirin could be used with 10 μM or more of DHEA-S. This observation could be important since the success-rate of ribavirin therapy is dose-dependent. Particularly in the context of the treatment of chronic hepatitis E, prolonged ribavirin therapy is necessary to eradicate the viral infection. Keeping the ribavirin dosing as high as possible and avoiding any dose decrease due to its side effects is important to improve the success rate and to avoid the selection of ribavirin resistant viruses (Todt et al., 2016). DHEA, or alternatively, the future use of new G6PD inhibitors, could offer interesting approaches for this purpose (Hamilton et al., 2012).

5. Conclusion

In conclusion, our results suggest that the main mechanism by which DHEA may prevent ribavirin-induced anemia is the rescue of intraerythrocytic ATP via G6PD inhibition. Our graphical abstract summarizes the proposed mechanism and the main results of this study (See Scheme 1).

Acknowledgements

We thank Marco Vignuzzi (Pasteur Institute of Paris) for providing us with the pCB3 Nancy strain infectious cDNA plasmid.

We are grateful to Emma Catteau and Valerie Constans for providing English corrections.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.09.002>.

References

- Ampuero, J., Romero-Gomez, M., 2016. Pharmacogenetics of ribavirin-induced anemia in hepatitis C. *Pharmacogenomics* 17, 1587–1594.
- Beaucourt, S., Vignuzzi, M., 2014. Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance. *Curr. Opin. Virol.* 8, 10–15.
- Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, J.C., Lohr, G.W., Ramot, B., Valentine, W.N., 1977. International Committee for Standardization in Haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br. J. Haematol.* 35, 331–340.
- Bodeau, S., Lemouel, J.P., Diouf, M., Duverlie, G., Nguyen-Khac, E., Brochot, E., 2017. Hemoglobin during ribavirin-based HCV therapy is closely related to circulating levels of DHEA. *J. Med. Virol.* 89 (6), 1033–1039.
- Brochot, E., Bodeau, S., Nguyen-Khac, E., Duverlie, G., 2014. DHEA and progesterone have a protective effect on ribavirin-induced hemolysis. *J. Hepatol.* 60, 897–898.
- Brochot, E., Castelain, S., Duverlie, G., Capron, D., Nguyen-Khac, E., Francois, C., 2010. Ribavirin monitoring in chronic hepatitis C therapy: anaemia versus efficacy. *Antivir. Ther.* 15, 687–695.
- Brochot, E., Duverlie, G., Castelain, S., Morel, V., Wychowski, C., Dubuisson, J., Francois, C., 2007. Effect of ribavirin on the hepatitis C virus (JFH-1) and its correlation with interferon sensitivity. *Antivir. Ther.* 12, 805–813.
- Brochot, E., Francois, C., Castelain, S., Helle, F., Van Nhien, A.N., Duchaussoy, I., Capron, D., Nguyen-Khac, E., Duverlie, G., 2012. A new tool to study ribavirin-induced haemolysis. *Antivir. Ther.* 17, 1311–1317.
- De Franceschi, L., Fattovich, G., Turrini, F., Ayi, K., Brugnara, C., Manzato, F., Noventa, F., Stanzial, A.M., Solero, P., Corrocher, R., 2000. Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology* 31, 997–1004.
- Deutsch, J., 1978. Maleimide as an inhibitor in measurement of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Clin. Chem.* 24, 885–889.
- Endres, C.J., Moss, A.M., Ke, B., Govindarajan, R., Choi, D.S., Messing, R.O., Unadkat, J.D., 2009. The role of the equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in transport and metabolism of ribavirin by human and wild-type or Ent1-/- mouse erythrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329, 387–398.
- Feld, J.J., Jacobson, I.M., Sulkowski, M.S., Poordad, F., Tatch, F., Pawlotsky, J.M., 2017. Ribavirin revisited in the era of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Liver Int.* 37, 5–18.
- Gordon, G., Mackow, M.C., Levy, H.R., 1995. On the mechanism of interaction of steroids with human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 25–29.
- Graci, J.D., Cameron, C.E., 2006. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev. Med. Virol.* 16, 37–48.
- Hamilton, N.M., Dawson, M., Fairweather, E.E., Hamilton, N.S., Hitchin, J.R., James, D.L., Jones, S.D., Jordan, A.M., Lyons, A.J., Small, H.F., Thomson, G.J., Waddell, I.D., Ogilvie, D.J., 2012. Novel steroid inhibitors of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *J. Med. Chem.* 55, 4431–4445.
- Homma, M., Hosono, H., Hasegawa, Y., Kohda, Y., 2009. Morphological transformation and phosphatidylserine exposure in erythrocytes treated with ribavirin. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1940–1942.
- Inoue, Y., Homma, M., Matsuzaki, Y., Shibata, M., Matsumura, T., Ito, T., Kohda, Y., 2006. Erythrocyte ribavirin concentration for assessing hemoglobin reduction in interferon and ribavirin combination therapy. *Hepatol. Res.* 34, 23–27.
- Jiang, Y., Zhu, Y., Mu, Q., Luo, H., Zhi, Y., Shen, X., 2017. Oxymatrine provides protection against Coxsackievirus B3-induced myocarditis in BALB/c mice. *Antivir. Res.* 141, 133–139.
- Kamar, N., Izopet, J., Tripon, S., Bismuth, M., Hillaire, S., Dumortier, J., Radenne, S., Coilly, A., Garrigue, V., D'Alteroche, L., Buchler, M., Couzi, L., Lebray, P., Dharancy, S., Minello, A., Hourmant, M., Roque-Afonso, A.M., Abravanel, F., Pol, S., Rostaing, L., Mallet, V., 2014. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 370, 1111–1120.
- Kleinegris, M.C., Koek, G.H., Mast, K., Mestrom, E.H., Wolfs, J.L., Bevers, E.M., 2012. Ribavirin-induced externalization of phosphatidylserine in erythrocytes is predominantly caused by inhibition of aminophospholipid translocase activity. *Eur. J. Pharmacol.* 693, 1–6.
- Klump, W.M., Bergmann, I., Muller, B.C., Ameis, D., Kandolf, R., 1990. Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 64, 1573–1583.
- Leowattana, W., 2004. DHEAS as a new diagnostic tool. *Clin. Chim. Acta* 341, 1–15.
- Loustaud-Ratti, V., Maynard, M., Thevenon, S., Pradat, P., Rousseau, A., Alain, S., Deny, P., Gagnieu, M.C., Tran, A., Dao, T., Silvain, C., Lunel-Fabiani, F., Picard, N., Zublana, I., Marquet, P., Trepo, C., Group, R., 2016. Efficiency and safety of an early dose adjustment of ribavirin in patients infected with hepatitis C under-exposed to the drug and treated with peginterferon ribavirin. *Ther. Drug Monit.* 38, 684–692.
- Marks, P.A., Banks, J., 1960. Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 46, 447–452.
- Mikeladze, M., Hedrington, M.S., Joy, N., Tate, D.B., Younk, L.M., Davis, I., Davis, S.N.,

2016. Acute effects of oral dehydroepiandrosterone on counterregulatory responses during repeated hypoglycemia in healthy humans. *Diabetes* 65, 3161–3170.
- Morsches, B., Benes, P., Holzmann, H., Henrich, B., 1981. [Penetration kinetics of dehydroepiandrosterone through the erythrocyte membrane (author's transl)]. *Arch. Dermatol. Res.* 270, 49–55.
- Mortola, J.F., Yen, S.S., 1990. The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 696–704.
- Paeshuyse, J., Dallmeier, K., Neyts, J., 2011. Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action. *Curr. Opin. Virol.* 1, 590–598.
- Page, T., Connor, J.D., 1990. The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells. *Int. J. Biochem.* 22, 379–383.
- Richardson, B.A., Overbaugh, J., 2005. Basic statistical considerations in virological experiments. *J. Virol.* 79, 669–676.
- Ronzoni, L., Aghemo, A., Rumi, M.G., Prati, G., Colanecce, A., Porretti, L., Monico, S., Colombo, M., Cappellini, M.D., 2014. Ribavirin suppresses erythroid differentiation and proliferation in chronic hepatitis C patients. *J. Viral Hepat.* 21, 416–423.
- Scherzer, T.M., Stattermayer, A.F., Stauber, R., Maieron, A., Strasser, M., Laferl, H., Schwarzer, R., Datz, C., Rutter, K., Beinhardt, S., Steindl-Munda, P., Hofer, H., Ferenci, P., 2013. Effect of gender and ITPA polymorphisms on ribavirin-induced anemia in chronic hepatitis C patients. *J. Hepatol.* 59, 964–971.
- Schopf, R.E., Muller, F.J., Benes, P., Morsches, B., 1986. Augmented glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and normal penetration and metabolism of dehydroepiandrosterone in mononuclear leukocytes in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* 278, 393–397.
- Testoni, B., Durantel, D., Lebosse, F., Fresquet, J., Helle, F., Negro, F., Donato, M.F., Levrero, M., Zoulim, F., 2016. Ribavirin restores IFN α responsiveness in HCV-infected livers by epigenetic remodelling at interferon stimulated genes. *Gut* 65, 672–682.
- Thorburn, D.R., Kuchel, P.W., 1985. Regulation of the human-erythrocyte hexose-monophosphate shunt under conditions of oxidative stress. A study using NMR spectroscopy, a kinetic isotope effect, a reconstituted system and computer simulation. *Eur. J. Biochem.* 150, 371–386.
- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.C., Tian, X., Stanton, R.C., 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J. Biol. Chem.* 273, 10609–10617.
- Todt, D., Walter, S., Brown, R.J.P., Steinmann, E., 2016. Mutagenic effects of ribavirin on hepatitis E virus -viral extinction versus selection of fitness-enhancing mutations. *Viruses* 8, 283.
- Torres, N.I., Castilla, V., Bruttomesso, A.C., Eiras, J., Galagovsky, L.R., Wachsmann, M.B., 2012. In vitro antiviral activity of dehydroepiandrosterone, 17 synthetic analogs and ERK modulators against herpes simplex virus type 1. *Antivir. Res.* 95, 37–48.
- van Soest, H., Renooij, W., van Erpecum, K.J., 2009. Clinical and basal aspects of anemia during antiviral therapy for hepatitis C. *Ann. Hepatol.* 8, 316–324.
- Welle, S., Jozefowicz, R., Statt, M., 1990. Failure of dehydroepiandrosterone to influence energy and protein metabolism in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 1259–1264.
- Wu, L.S., Jimmerson, L.C., MacBrayne, C.E., Kiser, J.J., D'Argenio, D.Z., 2016. Modeling ribavirin-induced anemia in patients with chronic hepatitis C virus. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 5, 65–73.

INHIBITION PAR LA DHEA DE L'HEMOLYSE INDUITE PAR LA RIBAVIRINE

Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie
Université de Picardie Jules Verne
Année 2018

Mots-clés : DHEA, Ribavirine, Anémie, Hémolyse, Glycolyse

Résumé : La ribavirine est un antiviral au large spectre d'action. Malheureusement, l'anémie induite par la ribavirine est une source de faible observance voire d'arrêt du traitement par les patients. Notre équipe a observé que la déhydroépiandrostérone (DHEA) avait un effet protecteur et inhibait l'hémolyse induite par la ribavirine *in vivo* et *in vitro*. Le but de cette étude est de mieux comprendre le mécanisme d'action de la DHEA dans ce contexte.

La DHEA a pu réduire la déplétion d'ATP intraérythrocytaire induite par la ribavirine. La DHEA a aussi permis aux globules rouges de conserver leur taille d'origine et a limité l'exposition extramembranaire des phosphatidylsérines. Elle a inhibé l'hémolyse induite par la ribavirine : 34% versus 46,5% d'hémolyse à 72h ($p < 0,01$). La DHEA est un inhibiteur de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), une enzyme clef de la voie des pentoses phosphates connectée à la glycolyse qui fournit de l'ATP aux globules rouges. Nous avons pu confirmer cet effet inhibiteur en présence de ribavirine. Toutes ces observations suggèrent que l'anémie induite par la ribavirine est initiée par une déplétion de l'ATP et que l'effet inhibiteur sur la G6PD est capable de secourir assez d'ATP pour ralentir cette déplétion et réduire l'hémolyse. Ce mécanisme pourrait être utile dans l'amélioration de la prise en charge des patients traités par la ribavirine.

Key words : DHEA, Ribavirin, Anemia, Hemolysis, Glycolysis

Summary : Ribavirin has been widely used for antiviral therapy. Unfortunately, ribavirin-induced anemia is often a cause of limiting or interrupting treatment. Our team has observed that dehydroepiandrosterone (DHEA) has a protective effect against *in vitro* and *in vivo* ribavirin-induced hemolysis. The aim of this study was to better understand this effect as well as the underlying mechanism(s). DHEA was able to reduce *in vitro* intraerythrocytic ATP depletion induced by ribavirin. DHEA also helped erythrocytes conserve their size and reduced phosphatidylserine exposure at the outer membrane. DHEA also inhibits ribavirin-induced hemolysis, i.e. 34% vs 46.5% at 72 h ($p < 0.01$). DHEA is an inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), a key enzyme in the hexose monophosphate shunt connected to the glycolytic pathway which is the only energy supplier of the red blood cell in the form of ATP. We have confirmed this inhibitory effect in the presence of ribavirin. All these observations suggest that ribavirin-induced hemolysis was initiated by ATP depletion, and that the inhibitory effect of DHEA on G6PD was able to rescue enough ATP to limit this hemolysis. This mechanism could be important for improving the therapeutic management of patients treated with ribavirin.

COMPOSITION DU JURY

Président : - Professeur Gilles DUVERLIE, Virologie, CHU Amiens

Membres : - Docteur Cécile-Marie ALIOUAT-DENIS, Virologie, CHU Lille

- Docteur Christine PANNIER, Virologie, CHU Amiens

- Docteur Mailys LE GUYADER, Hématologie, CHU Amiens

- Docteur Etienne BROCHOT, Virologie, CHU Amiens