



HAL
open science

Absence d'efficacité de la quinacrine dans le traitement des maladies à prions : possible explication à caractère pharmacologique

Nicole Picard-Hagen, Véronique V. Gayrard-Troy, Catherine Viguié, Valérie Laroute, P. Alayrac, Pierre-Louis Toutain

► To cite this version:

Nicole Picard-Hagen, Véronique V. Gayrard-Troy, Catherine Viguié, Valérie Laroute, P. Alayrac, et al.. Absence d'efficacité de la quinacrine dans le traitement des maladies à prions : possible explication à caractère pharmacologique. *Productions Animales*, 2004, 17, pp.101-108. hal-02676771

HAL Id: hal-02676771

<https://hal.inrae.fr/hal-02676771>

Submitted on 31 May 2020

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

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

UMR 181, INRA-ENVT, Physiopathologie
et Toxicologie expérimentales, Ecole
Nationale Vétérinaire de Toulouse,
23 chemin des Capelles, F-31076
Toulouse Cedex

Courriel : n.hagen-picard@envt.fr

Absence d'efficacité de la quinacrine dans le traitement des maladies à prions : possible explication à caractère pharmacologique

Résumé

En raison des incertitudes épidémiologiques relatives aux maladies à prions, il est urgent de découvrir et de développer des thérapeutiques anti-prions chez l'homme. L'efficacité des molécules candidates est essentiellement testée *in vitro* sur des cellules de neuroblastome. Pour plusieurs molécules, dont la quinacrine, il a été observé une discordance entre l'effet anti-prion *in vitro* et l'absence d'efficacité clinique dans le traitement de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Pour documenter l'hypothèse selon laquelle l'absence d'efficacité de la quinacrine était d'ordre pharmacocinétique (et donc prévisible), la disposition de la quinacrine (disparition de la quinacrine du compartiment sanguin, qui résulte par exemple de processus de distribution et d'élimination du principe actif) a été étudiée à la fois *in vivo* et *in vitro* afin de déterminer les doses qu'il conviendrait d'administrer *in vivo* pour obtenir des concentrations efficaces dans la biophase. Le modèle de brebis naturellement atteintes de tremblante a été utilisé. Dans un premier temps, un essai thérapeutique contrôlé sur des brebis en phase clinique de tremblante a permis de confirmer ce qui était connu chez l'homme, c'est-à-dire l'absence d'efficacité clinique de la quinacrine. Sur le modèle *in vitro* reproduisant les conditions princeps de culture pour lesquelles 50 % de l'effet anti-prion avait été observé, avec une concentration nominale de quinacrine de 300 nM (nanomoles par litre), nous avons redéterminé les EC₅₀ (concentration qui permet d'inhiber à 50 % la formation de PrP pathogène) pour les biophases potentielles de l'action anti-prion en mesurant sélectivement, par HPLC (chromatographie liquide haute performance), les véritables concentrations extracellulaire (120 nM) et intracellulaire (6700 nM) de quinacrine dans les neuroblastomes en culture. Les concentrations de quinacrine dans le Liquide Cérébro-Spinal (LCS) et le tissu nerveux cérébral, représentatifs *in vivo* respectivement des biophases extracellulaire et intracellulaire, ont été mesurées chez la brebis après une administration de quinacrine. Les concentrations de quinacrine dans le liquide cérébro-spinal (< 2,1 nM et 55 nM, obtenues respectivement pour des doses thérapeutique et toxique) sont restées très inférieures aux concentrations nécessaires pour obtenir *in vitro* un effet anti-prion (120 nM). Les concentrations totales de quinacrine dans le tissu nerveux (1040 nM) après une dose thérapeutique sont restées inférieures aux concentrations de quinacrine actives *in vitro* (6700 nM) et, seule une dose toxique de quinacrine a permis d'atteindre des concentrations intracellulaires actives (53800 nM). En définitive, quelle que soit la biophase intra- ou extracellulaire, les schémas posologiques non toxiques sont incapables de maintenir des concentrations anti-prion efficaces de quinacrine. A l'avenir, pour éviter des études *in vivo* dont on peut prévoir d'emblée qu'elles sont vouées à l'échec, notamment chez l'homme, il est recommandé de mesurer les EC₅₀ anti-prions dans les biophases *in vitro*, pour évaluer si les effets anti-prion observés *in vitro* sont extrapolables *in vivo*.

Introduction

L'émergence d'un nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (nMJC) dû à l'agent de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) a donné un nouvel essor aux recherches sur la thérapeutique des maladies à prions. En revanche, le traitement médical des animaux domestiques n'est pas envisageable pour des raisons de santé publique, l'éradication de la maladie étant le seul objectif sanitaire à atteindre.

Dans ce contexte, les essais thérapeutiques menés par notre groupe sur la tremblante naturelle ne se justifient que par les apports de la thérapeutique comparée, la tremblante du mouton étant utilisée comme un modèle de maladie naturelle à prions. Ce modèle a été utilisé pour tester des hypothèses thérapeutiques et pour comprendre l'origine des échecs thérapeutiques observés avec la quinacrine à la fois chez l'homme et chez l'animal (Rapport AFSSAPS 2002, Furukawa *et al* 2002, Collins *et al* 2002, Folette 2003) et pour laquelle nous allons apporter des éléments d'explication quant à son inefficacité thérapeutique.

1 / Quelles sont les molécules utilisées pour traiter les maladies à prions ?

La maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) concerne un nombre très limité de patients (125 cas de MCJ en France en 2002). Elle est donc considérée comme une maladie orpheline. Il en résulte que la découverte et le développement de molécules anti-prions susceptibles d'être utilisées pour traiter la MCJ

ne peut pas suivre les voies classiques d'un développement pharmaceutique car cela implique des délais et des coûts incompatibles avec l'incidence de la maladie. A titre indicatif, le coût moyen d'un essai clinique pour une nouvelle molécule est estimé actuellement à environ 500 millions d'euros (Frantz 2003). Cela explique que les thérapeutiques anti-prions actuellement testées chez l'homme font largement appel à des molécules déjà connues, notamment pour leur sécurité d'emploi : antibiotiques (tétracyclines), antifongiques (amphotéricine B), antipaludiques

(quinacrine), neuroleptiques (chlorpromazine),...

Ces molécules ont été sélectionnées pour leur capacité à interférer *in vitro* avec une étape du cycle de formation ou de dégradation de la protéine prion pathologique ou encore à empêcher, *in vivo*, le processus de neuro-invasion. Le tableau 1 recense les principales molécules faisant l'objet d'investigation pour leur potentiel thérapeutique avec leur mécanisme d'action présumé (Supattapone *et al* 2002, Koster *et al* 2003).

Tableau 1. Classes de molécules présentant une activité anti-prion *in vitro* et/ou *in vivo*.

Molécule	Efficacité anti-prion	Références
Rouge Congo ou analogues synthétiques	Augmentation de la période d'incubation Inhibition de la replication de PrP ^{Sc} <i>in vitro</i>	Caughey et Race 1992 Rudyk <i>et al</i> 2000
Polyanions sulfatés Dextran sulfate polyanionique, Pentosan sodium polysulfate	Inhibition de la replication de PrP ^{Sc} <i>in vitro</i> (sc+-MNBs) Augmentation de la période d'incubation (souris)	Caughey et Raymond 1993 Diringer et Ehlers 1991 Farquhar <i>et al</i> 1999
Antibiotiques polyènes Amphotéricine B Tétracyclines Dérivé de l'anthracycline (iododoxorubicin (IDX)) Filipin	Augmentation de la durée de survie (hamster) et diminution de l'accumulation de PrPres <i>in vitro</i> (ScN2a et GT1-7) et <i>in vivo</i> Prévention de l'agrégation et de la résistance à la protéase de peptides PrP <i>in vitro</i> Augmentation de la durée de survie si inoculat incubé avec IDX (hamster) Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a)	Pocchiari <i>et al</i> 1989, Mange <i>et al</i> 2000 Tagliavini <i>et al</i> 2000 Tagliavini <i>et al</i> 1997 Marella <i>et al</i> 2002
Polyamines branchées	Augmentation de l'élimination de la PrP ^{Sc} (ScN2a)	Supattapone <i>et al</i> 1999, 2001
Tétrapyrroles Phthalocyanine sulfates (PcTS), porphyrines	Inhibition de la formation de PrPres (mod. ScNB) Augmentation de la durée de survie	Priola <i>et al</i> 1999 Priola <i>et al</i> 2000 Caughey <i>et al</i> 1998
Dérivés de l'acridine quinacrine	Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a)	Doh-Ura <i>et al</i> 2000
Dérivés de la phénothiazine chlorpromazine	Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a)	Korth <i>et al</i> 2001
Inhibiteurs basés sur la structure de la PrP recombinante : Cp-60	Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a)	Perrier <i>et al</i> 2000
Anticorps anti-PrP recombinant Fab D18 (reconnaît l'épitope 132-156)	Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a) Prolongation de la période d'incubation (souris)	Peretz <i>et al</i> 2001 White <i>et al</i> 2003
Peptide PrP synthétique Fragment P109-141	Inhibition de la formation de PrP pathogène <i>in vitro</i>	Chabry <i>et al</i> 1998
Peptides "destructeurs" des feuillettes β	Inhibition de la formation de PrP pathogène <i>in vitro</i>	Soto <i>et al</i> 2000
Récepteurs des lymphotoxines – β	Inhibition des cellules folliculaires dendritiques de la rate et retard de la neuroinvasion (souris)	Montrasio <i>et al</i> 2000
Inhibiteurs des compléments C1q ou C3	Inhibition de l'accumulation de PrP ^{Sc} dans les cellules folliculaires dendritiques des organes lymphoïdes Augmentation de la durée de survie (souris)	Mabbott <i>et al</i> 2001

2 / Les essais menés sur des modèles *in vivo*

La mise en évidence d'un effet anti-prion fait appel schématiquement à deux types d'approches : des approches *in vitro* (qui sont envisagées dans le chapitre suivant) et des approches *in vivo* visant à démontrer les propriétés préventives ou curatives de la molécule. Pour la mise en évidence d'effet préventif, on a recours à des modèles d'animaux infectés expérimentalement ; le traitement est initié avant l'apparition des signes cliniques, et le critère de jugement retenu est la durée d'incubation de la maladie. Par exemple, un traitement préventif avec un analogue de l'amphotéricine B a permis de retarder l'apparition des signes cliniques et l'accumulation de PrP^{sc} dans le système nerveux central, sur un modèle de hamsters expérimentalement infectés (Adjou *et al* 2000).

Pour les essais à visée curative, il est illusoire d'espérer obtenir une guérison totale car les lésions neuronales observées, même en début de phase clinique, sont irréversibles. Le traitement est ici essentiellement palliatif, il vise à retarder l'évolution de la maladie, à augmenter la durée de survie et à améliorer la qualité de la vie des patients (Aguzzi *et al* 2001).

C'est dans cette optique que la quinacrine a été proposée dans le traitement compassionnel de la MCJ (se dit du traitement d'une maladie dont l'issue est toujours fatale). En raison de son utilisation en médecine humaine depuis de nombreuses années et de son caractère lipophile, la quinacrine constituait un candidat potentiel pour le traitement des maladies à prions. Chez l'homme, la quinacrine a été directement utilisée chez des patients atteints de la MCJ sans aucune évaluation préclinique de son efficacité *in vivo*. A partir d'une revue de la littérature, il avait été anticipé que les concentrations actives *in vitro* pouvaient être atteintes dans la biophase *in vivo*. Les patients ont été traités avec la dose généralement recommandée chez l'homme pour des traitements antipaludéens (approximativement, 300 mg par jour par voie orale, Shannon *et al* 1944, Goodman et Gilman 1960). Jusqu'à présent, tous les patients atteints de MJC, traités avec la quinacrine, sont décédés, sans modification de la progression de la maladie (Rapport AFSSAPS 2002, Furukawa *et al* 2002, Folette 2003).

Compte tenu du caractère observationnel de ces résultats cliniques (avec notamment une absence de lot témoin), il était important de les confirmer (ou de les infirmer) dans le cadre d'un essai expérimental comparatif. C'est avec cet objectif que nous avons testé la quinacrine sur des animaux atteints de tremblante naturelle.

Des brebis de race Manech Tête Rousse, cliniquement atteintes de tremblante (n = 23), ont été incluses dans un essai clinique. Elles ont été réparties de façon aléatoire en deux lots, un lot traité et un lot témoin non traité.

Les brebis du lot traité ont reçu par voie intramusculaire une administration quotidienne de quinacrine à la dose de 150 mg *in toto* et de chlorpromazine à la dose de 100 mg *in toto*. La chlorpromazine a été associée à la quinacrine, comme cela a été recommandé chez l'homme (Korth *et al* 2001). La voie orale n'a pas été utilisée en raison de la particularité digestive des ruminants. La durée du traitement a été soit de 7 jours (6 brebis), soit d'une durée nominale de 30 jours (5 brebis). La durée de survie des brebis traitées pendant 7 jours (médiane = 45 j ; étendue de 9 à 90 j ; n = 6) ou traitées pendant une durée nominale de 30 jours (médiane = 22 j ; étendue de 6 à 91 j ; n = 5) n'a pas été supérieure à celle des 12 brebis non traitées (médiane = 36 j ; étendue de 13 à 72 j). La conclusion est que la quinacrine en association avec la chlorpromazine, avec un schéma posologique analogue à celui qui a été utilisé chez l'homme, n'a pas eu d'influence sur le décours temporel de la maladie naturelle chez le mouton.

Ces résultats expérimentaux confirment donc ce qui a été observé aussi bien chez l'homme qu'avec un modèle de souris expérimentalement infectées par le prion et traitées avec 10 mg.kg⁻¹.jour⁻¹ de quinacrine par voie orale (Collins *et al* 2002).

Compte tenu de ces échecs, il était important de comprendre pourquoi des molécules apparemment actives *in vitro* ont été inefficaces cliniquement, afin de ne pas donner de faux espoirs aux malades atteints de la MCJ. L'objectif de nos investigations a été d'explorer les origines possibles du découplage entre une action anti-prion de la quinacrine démontrée *in vitro* et une absence d'efficacité clinique. Notre hypothèse a été que les concentrations inhibitrices (l'EC₅₀ est la concentration qui permet d'inhiber à 50 % la formation de PrP pathogène) rapportées dans la littérature (et que l'on a tenté de reproduire *in vivo* lors des essais cliniques) n'ont pas été évaluées de façon optimale et que les concentrations en quinacrine requises *in vivo* dans la biophase pour obtenir un effet clinique sont impossibles à atteindre avec le schéma posologique retenu pour cette molécule.

3 / Les modèles *in vitro* : de la mise en évidence d'une action anti-prions à la détermination d'une concentration efficace pour le thérapeute

Les modèles *in vitro*, par exemple les cellules de neuroblastomes (Beranger *et al* 2001), sont largement utilisés pour cribler l'action inhibitrice de la molécule sur la formation de la protéine prion pathogène (PrP^{sc}). Ils permettent également d'approfondir le mécanisme d'action de la molécule et de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la réplication de la PrP^{sc} (Caughey et Baron 2002).

Actuellement, de nombreux travaux indiquent que c'est l'interaction entre la PrP^{Sc} néoformée et la PrP^C qui permet la transconformation de la protéine cellulaire en protéine pathogène. Cette étape constitue un événement central dans la physiopathologie des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) et oriente vers la sélection de substances capables d'inhiber ce processus de conversion, en modifiant l'interaction entre la PrP^{Sc} et la PrP^C ou encore en déstabilisant la structure de la PrP^{Sc}.

La connaissance de ce mécanisme d'action a permis de cribler des molécules dont les caractéristiques physico-chimiques étaient compatibles avec de possibles propriétés anti-prions. Ainsi, Perrier *et al* (2000) ont sélectionné *in silico* (sur ordinateur) à partir d'une banque de molécules présentant une structure susceptible de bloquer un site de la PrP^C impliqué dans sa transconformation en PrP^{Sc}, 63 substances dont l'efficacité anti-prion a ensuite été testée sur des cellules en culture.

Par ailleurs, Doh-Ura *et al* (2000) et Korth *et al* (2001) ont ouvert des perspectives de traitement des maladies à prions en démontrant que la quinacrine (un antipaludéen) et la chlorpromazine (un neuroleptique) étaient capables d'inhiber la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} dans des cellules en culture de neuroblastomes de souris chroniquement infectées par la PrP^{Sc} avec, pour les deux molécules, respectivement des « EC₅₀ » de 300 nM (142 ng/mL) et de 3000 nM (1066 ng/mL). En outre, avec des concentrations de quinacrine supérieures à 400 nM, une cure totale des cellules est observée, trois semaines après l'arrêt du traitement.

Lorsque l'action inhibitrice d'une molécule sur la formation de PrP^{Sc} est avérée, il convient d'en établir la relation dose-effet afin d'évaluer les deux paramètres pharmacodynamiques qui permettront d'en apprécier le potentiel thérapeutique : l'efficacité (efficacy) et la puissance (potency).

L'efficacité exprime la réponse du système *in vitro* à la molécule testée. La valeur absolue de ce paramètre (ex. : inhibition de la formation de la PrP^{Sc} de x % ou augmentation de y % de son élimination) n'a d'intérêt que dans la mesure où on veut comparer plusieurs molécules entre elles. En revanche, pour une molécule donnée, la valeur absolue de ce paramètre est d'un intérêt secondaire car il dépend tout autant du modèle d'étude que de la molécule testée. Le paramètre qui doit être évalué avec justesse est la puissance de la molécule. La puissance se mesure par la valeur de la concentration inhibitrice 50 % (IC₅₀ ou EC₅₀) c'est-à-dire la concentration de la molécule pour laquelle on obtient 50 % de la réponse maximale.

Pour les molécules ayant une activité anti-prion, et notamment pour la quinacrine, des « EC₅₀ » ont été rapportées dans la littérature (tableau 2) et c'est en se fondant sur ces valeurs qu'ont été sélectionnées les molécules candidates pour le traitement d'une

MCJ. En fait, il importe de remarquer que ces EC₅₀ ne sont pas des EC₅₀ *sensu stricto* mais plutôt les concentrations nominales imposées au milieu de culture. C'est ainsi que l'EC₅₀ rapportée pour la quinacrine par Korth *et al* (2001), ne permet que de calculer la dose (et non pas la concentration) nominale de quinacrine que l'on doit apporter avec 4 mL de milieu de culture, changé tous les deux jours au cours d'un essai de sept jours pour obtenir 50 % d'efficacité. En effet, *in vitro*, comme *in vivo*, la molécule testée doit diffuser jusqu'à sa biophase, elle peut subir des transformations, être dégradée ou métabolisée, elle peut s'accumuler dans certains compartiments ou s'adsorber sur les parois du matériel, etc. Ce type de considération est rarement pris en compte dans les essais *in vitro* dont l'échelle de temps est courte, mais il prend tout son sens pour des essais dont les réponses sont jugées après plusieurs jours d'exposition (sept jours pour la quinacrine) et pour lesquels le milieu de culture est renouvelé plusieurs fois (Kenakin 1997, pour une discussion générique sur cette question).

En outre, il n'y a aucune certitude concernant la nature de la biophase pour l'effet anti-prion : intracellulaire *versus* extracellulaire. En effet, le site et le mécanisme d'action de la quinacrine ne sont pas clairement élucidés. Des études sur les cellules de neuroblastomes (ScN2a) ont montré que la transconformation de la PrP cellulaire en PrP^{Sc} survenait au cours d'un cycle d'endocytose (apport cellulaire de matériaux extracellulaires par des vacuoles ou des microvésicules), soit à la surface membranaire, soit dans des structures intracellulaires (endosomes ou lysosomes) (Shyng *et al* 1993, Beranger *et al* 2003). Ces résultats suggèrent que la biophase de la quinacrine puisse être intracellulaire, mais on ne peut toutefois pas exclure une biophase extracellulaire. En bref, rien ne garantit que les EC₅₀ rapportées (c'est-à-dire, la concentration extracellulaire de quinacrine présumée dans un milieu de culture) aient une signification thérapeutique surtout si la vraie biophase est intracellulaire.

Cela nous a conduit à ré-estimer les EC₅₀ (intra- et extra-cellulaires) de la quinacrine à partir des concentrations mesurées et non imposées au milieu de culture.

Au cours d'une étude *in vitro* reproduisant les conditions dans lesquelles l'effet anti-prion a été observé (Korth *et al* 2001), nous avons dans un premier temps observé une perte non spécifique de 34 ± 8 % de quinacrine après dilution de la solution de travail à la concentration de 21 µM et filtration à travers un filtre de 0,2 µm. Ce résultat est en accord avec des études montrant que la quinacrine se fixe sur de nombreux supports (Björkman et Elisson 1987).

Dans un second temps, pour documenter la répartition de la quinacrine en terme de biophase intra- et extra-cellulaires, nous avons mesuré l'évolution temporelle des concentrations de quinacrine dans les secteurs intracellulaires et extracellulaires sur des cellules de neuroblastomes de souris non infectées (N2a,

Tableau 2. Puissance des molécules (EC50) présentant une activité anti-prion *in vitro*.

Molécule	Efficacité anti-prion	EC ₅₀	Références
Rouge Congo ou analogues synthétiques : Chrysamine G Sirius red	Inhibition de la replication de PrP ^{Sc} (SMB)	100 µM 1 µM	Rudyk <i>et al</i> 2000
Antibiotiques polyènes Filipin	Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a)	2 µM	Marella <i>et al</i> 2002
Polyamines branchées Polyamidoamine (PANAM G4.0) Polypropylèneimine dendrimère (PPI G4.0)	Augmentation de l'élimination de la PrP ^{Sc} (ScN2a)	5,6 nM 23 nM	Supattapone <i>et al</i> 1999, 2001
Tétrapyrroles Phthalocyanine sulfates (PcTS)	Inhibition de la formation de PrPres (modèle ScNB)	0,5-1 µM	Priola <i>et al</i> 1999 Caughey <i>et al</i> 1998
Dérivés de l'acridine quinacrine	Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a)	300 nM	Doh-Ura <i>et al</i> 2000
Dérivés de la phénothiazine chlorpromazine	Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a)	3 µM	Korth <i>et al</i> 2001
Inhibiteurs basés sur la structure de la PrP recombinante : Cp-60	Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a)	18 µM	Perrier <i>et al</i> 2000
Anticorps anti-PrP recombinant : Fab D18 (reconnaît l'épitope 132-156)	Inhibition de la formation de PrP ^{Sc} (ScN2a)	9 nM	Peretz <i>et al</i> 2001
Peptide PrP synthétique Fragment P109-141	Inhibition de la formation de PrP pathogène <i>in vitro</i>	30 µM	Chabry <i>et al</i> 1998

Lehmann *et al* 1995), au cours d'une période de culture de 2 à 7 jours. Les concentrations de quinacrine ont été mesurées par HPLC (chromatographie liquide haute performance). Il est apparu que la concentration de la quinacrine dans la phase liquide de la culture était restée relativement constante pendant les sept jours (en moyenne, 120 nM ; étendue : 100-140 nM), alors que la concentration nominale de la solution préparée était environ trois fois supérieure, 300 nM.

Les concentrations intracellulaires de quinacrine ont été calculées en estimant le volume cellulaire à 50 µL pour une monocouche de cellules subconfluentes (*i.e.* une surface de 25 cm² et de 20 µm d'épaisseur) ; les concentrations ont varié entre 2100 nM et 6700 nM pendant les sept jours de culture, c'est-à-dire des valeurs environ 20 à 50 fois supérieures à celles des concentrations extracellulaires (120 nM).

Cette étude de disposition *in vitro* suggère que la quinacrine se répartit entre la phase liquide (extracellulaire) et le compartiment intracellulaire et s'accumule à l'intérieur des cellules de neuroblastomes. En d'autres termes, l'EC₅₀ *in vitro* se situe entre 2100 nM et 6700 nM si la biophase est intracellulaire, alors que l'EC₅₀ n'est que de 120 nM si la biophase est extracellulaire.

4 / Comment calculer une dose anti-prion pour une molécule d'intérêt lorsque les concentrations efficaces ont été déterminées *in vitro* ?

La seule concentration que sache contrôler un thérapeute par un schéma posologique approprié est la concentration plasmatique. A ce titre, la concentration thérapeutique d'un médicament fait référence à sa concentration plasmatique et non à la concentration dans la biophase. Lorsque la concentration thérapeutique est connue, la détermination de la dose efficace est simplement obtenue par l'équation 1 :

$$\text{Dose thérapeutique} = \frac{\text{Clairance} \times \text{concentration thérapeutique}}{\text{Biodisponibilité}} \quad \text{équation 1}$$

Dans l'équation 1, la Clairance est la clairance plasmatique du médicament (connu pour les molécules anciennes) et la Biodisponibilité, un facteur allant de 0 à 1 et qui exprime le pourcentage de la molécule qui accède à la circulation générale à partir de son site d'administration.

Pour la quinacrine, la clairance plasmatique chez l'homme est estimée à 22 mL.min⁻¹.kg⁻¹ (Björkman *et al* 1989). La clairance est connue pour plusieurs molécules à potentiel anti-prion comme la doxycycline (0,53 mL.min⁻¹.kg⁻¹), la chlorpromazine (18 mL.min⁻¹.kg⁻¹) et l'application de l'équation 1 nécessite uniquement d'estimer les concentrations thérapeutiques, c'est-à-dire les concentrations plasmatiques pour lesquelles des concentrations appropriées sont obtenues dans la biophase.

Dans les conditions d'équilibre (ou de pseudo-équilibre), il y aura un rapport constant entre les concentrations plasmatiques du médicament et les concentrations dans la biophase car ce sont les concentrations plasmatiques qui « contrôlent » les concentrations dans la biophase.

Pour une action curative anti-prion, la biophase n'est pas connue avec précision mais il est raisonnable de la situer dans le système nerveux central avec deux types de localisation possibles : une localisation extracellulaire ou une localisation intracellulaire. La question posée est donc de déterminer le rapport des concentrations entre le plasma et les deux biophases possibles dans le système nerveux.

La barrière hémato-méningée (BHM) est une barrière pouvant s'interposer entre le plasma et le système nerveux. Elle peut s'opposer au passage des molécules d'intérêt lorsqu'elles n'ont pas les propriétés physicochimiques adéquates pour un passage transcellulaire (ex. : lipophilicité), ce qui est le cas des anticorps bloquants, du dextran sulfate polyanionique (DS 500), de l'anthracycline. La BHM peut également ré-expulser vers le plasma des molécules ayant été capables de ce franchissement mais qui sont des substrats de ses pompes à efflux (ex. : tétracycline, substrat des P-glycoprotéines). Il importe donc de mesurer expérimentalement le rapport entre le plasma et les concentrations dans les différents secteurs du système nerveux central pouvant être la biophase d'une action anti-prion. En pratique, le liquide cérébro-spinal peut être considéré comme représentatif d'une biophase extracellulaire (De Lange et Danhof 2002), alors que les concentrations tissulaires totales peuvent être considérées comme représentatives d'une concentration à atteindre pour une biophase intracellulaire.

Au cours d'une étude *in vivo* chez la brebis, nous avons mesuré dans le tissu cérébral et le LCS (liquide cérébro-spinal) les concentrations en quinacrine, 24 h après une administration de 150 mg de quinacrine. Ces concentrations ont été de (moyenne ± SD) 1040 ± 200 nM pour le tissu cérébral (hémisphère cérébral) et elles ont été indétectables avec notre technique analytique (< 2,1 nM) dans le LCS (liquide cérébro-spinal). La concentration plasmatique correspondante a été de 14 nM (6,5 ng/mL) ce qui donne un rapport tissu cérébral/plasma de 76 et un rapport LCS/plasma inférieur à 0,15.

Nous avons également estimé les concentrations maximales de quinacrine qui pouvaient être atteintes dans le système nerveux avec une perfusion intraveineuse d'une dose subléthale de quinacrine (2,6 g *in toto*). Cette administration a permis d'obtenir des concentrations de quinacrine 1000 fois supérieures dans le tissu cérébral (53800 nM), par rapport à celles observées dans le liquide cérébro-spinal (55 nM). Il est probable que la quinacrine, une base faible, soit piégée dans le lysosome dont le pH est acide, ce qui expliquerait sa faible concentration dans le milieu extracellulaire.

Si on considère que la biophase est extracellulaire et que la concentration de quinacrine dans le LCS est représentative de la biophase extracellulaire dans le système nerveux central, les concentrations de quinacrine mesurées dans le milieu de culture *in vitro* et permettant d'obtenir 50 % des effets maximum sur les neuroblastomes (120 nM), ne pourront jamais être atteintes *in vivo* avec une dose thérapeutique (< 2,1 nM) ni même après une dose subléthale (55 nM). De même, si on considère que la biophase est intracellulaire (c'est-à-dire, le site lysosomal), la concentration de quinacrine dans le cerveau après une seule administration à dose thérapeutique de quinacrine est encore 4 à 6 fois inférieure (1040 nM) à la concentration intracellulaire permettant d'observer 50 % des effets maximum *in vitro* (6700 nM). Seule une dose toxique de quinacrine permet d'atteindre, *in vivo*, des concentrations de quinacrine dans le cerveau supérieures (53800 nM) à l'EC₅₀ déterminée *in vitro*.

Conclusion

En conclusion, nos essais expérimentaux sur la tremblante naturelle de la brebis ont confirmé l'absence d'efficacité de la quinacrine pour ralentir la progression d'une maladie à prions. Cette inefficacité clinique pourrait être due à l'impossibilité de maintenir des concentrations anti-prion efficaces de quinacrine dans la biophase intra- ou extracellulaire avec les schémas posologiques non toxiques. Pour éviter de futures déceptions, nous pensons que les essais *in vitro*, à partir desquels sont estimées les concentrations actives des substances candidates, doivent inclure *a minima* une étude de la disposition de la molécule *in vitro*, pour en vérifier la stabilité *in vitro* et pour ne pas confondre concentration nominale et concentration réelle dans le milieu de culture. De plus, il convient de quantifier séparément les EC₅₀ intra- et extracellulaires, le rapport des EC₅₀ pouvant atteindre 50, dans le cas de la quinacrine. Enfin, on doit recommander de déterminer également ce rapport *in vivo*, l'exemple de la quinacrine ayant montré que ce rapport pouvait être très différent *in vitro* et *in vivo* (50 *versus* 1000).

Références

- Adjou K.T., Privat N., Demart S., Deslys J.P., Seman M., Hauw J.J., Dormont D., 2000. MS-8209, an amphotericin B analogue, delays the appearance of spongiosis, astrogliosis and PrPres accumulation in the brain of scrapie-infected hamsters. *Journal of Comparative Pathology*, 122, 3-8.
- Aguzzi A., Glatzel M., Montrasio F., Prinz M., Heppner F.L., 2001. Interventional strategies against prion diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 745-749.
- Beranger F., Mange A., Solassol J., Lehmann S., 2001. Cell culture models of transmissible spongiform encephalopathies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 311-316.
- Beranger F., Mange A., Lehmann S., 2003. Réticulum endoplasmique, protéasome et maladies à prions. *Médecine Sciences*, 19, 778-780.
- Björkman S., Elisson L.O., 1987. Determination of quinacrine (mepacrine) in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of chromatography*, 420, 341-348.
- Björkman S., Elisson L.O., Gabrielsson J., 1989. Pharmacokinetics of quinacrine after intrapleural instillation in rabbits and man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 41, 160-163.
- Caughey B., Baron G.S., 2002. Factors affecting interactions between prion protein isoforms. *Biochemical Society Transactions*, 30, 565-569.
- Caughey B., Race R.E., 1992. Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *Journal of Neurochemistry*, 59, 768-771.
- Caughey B., Raymond G.J., 1993. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *Journal of Virology*, 67, 643-650.
- Caughey W.S., Raymond L.D., Horiuchi M., Caughey B., 1998. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 12117-12122.
- Chabry J., Caughey B., Chesebro B., 1998. Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 13203-13207.
- Collins S.J., Lewis V., Brazier M., Hill A.F., Fletcher A., Masters C.L., 2002. Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Annals of Neurology*, 52, 503-506.
- De Lange E.C.M., Danhof M., 2002. Considerations in the use of cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target concentrations in the clinical setting: implications of the barriers between blood and brain. *Clinical Pharmacokinetics*, 41, 691-703.
- Diringer H., Ehlers B., 1991. Chemoprophylaxis of scrapie in mice. *Journal of General Virology*, 72, 457-460.
- Doh-Ura K., Iwaki T., Caughey B., 2000. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *Journal of Virology*, 74, 4894-4897.
- Farquhar C., Dickinson A., Bruce M., 1999. Prophylactic potential of pentosan polysulfate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*, 353, 117.
- Follette P., 2003. New perspectives for prion therapeutics meeting. Prion disease treatment's early promise unravels. *Science*, 299, 191-192.
- Frantz S., 2003. Why are clinical costs so high? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2, 851-852.
- Furukawa H., Takahashi M., Nakajima M., Yamada T., 2002. Prospects of the therapeutic approaches to Creutzfeldt-Jakob disease: a clinical trial of antimalarial, quinacrine. *Nippon Rinsho*, 60, 1649-1657.
- Goodman L.S., Gilman A., 1960. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 2nd ed., New York, Macmillan, p. 1167-1173.
- Kenakin T., 1997. *A Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*. 3rd ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, 491 p.
- Korth C., May B.C.H., Cohen F.E., Prusiner S.B., 2001. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98, 9836-9841.
- Koster T., Singh K., Zimmermann M., Gruys E., 2003. Emerging therapeutic agents for transmissible spongiform encephalopathies: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26, 315-326.
- Lehmann S., Harris D.A., 1995. A mutant prion protein displays an aberrant membrane association when expressed in cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 24589-24597.
- Mabbott N.A., Bruce M.E., Botto M., Walport M.J., Pepys M.B., 2001. Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nature Medicine*, 7, 485-487.
- Mange A., Nishida N., Milhøvet O., McMahon H.E.M., Casanova D., Lehmann S., 2000. Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *Journal of Virology*, 74, 3135-3140.
- Marella M., Lehmann S., Grassi J., Chabry J., 2002. Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *Journal of Biology Chemistry*, 277, 25457-25464.
- Montrasio F., Frigg R., Glatzel M., Klein M.A., Mackay F., Aguzzi A., Weissmann C., 2000. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*, 288, 1257-1259.
- Peretz D., Williamson R.A., Kaneko K., Vergara J., Leclerc E., Schmitt-Ulms G., Mehlhorn I.R., Legname G., Wormald M.R., Rudd P.M., Dwek R.A., Burton D.R., Prusiner S.B., 2001. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, 412, 739-743.
- Perrier V., Wallace A.C., Kaneko K., Safar J., Prusiner S.B., Cohen F.E., 2000. Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 6073-6078.
- Pocchiari M., Casaccia P., Ladogana A., 1989. Amphotericin B: A novel class of antiscrapie drugs. *Journal of Infectious Diseases*, 160, 795-802.
- Priola S.A., Caughey B., Caughey W.S., 1999. Novel therapeutic uses for porphyrins and phthalocyanines in the transmissible spongiform encephalopathies. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 563-566.
- Priola S.A., Raines A., Caughey W.S., 2000. Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, 287, 1503-1506.
- Rapport AFSSAPS 03/2002, 2002. Rapport préliminaire sur l'utilisation de la mepacrine chez 20 patients ayant un diagnostic de maladie de Creutzfeldt Jakob cliniquement probable. 10 p.
- Rudyk H., Vasiljevic S., Hennion R.M., Birkett C.R., Hope J., Gilbert I.H., 2000. Screening congo red and its analogues for their ability to prevent the formation of PrP-res in scrapie-infected cells. *Journal of General Virology*, 81, 1155-1164.
- Shannon J.A., Earle D.P., Brodie B.B., Taggart J.V., Berliner R.W., 1944. The pharmacological basis for the rational use of atabrine in the treatment of malaria. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 81, 307-330.
- Shyng S.L., Huber M.T., Harris D.A., 1993. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *Journal of Biology Chemistry*, 268, 15922-15928.
- Soto C., Kascsak R.J., Saborio G.P., Aucouturier P., Wisniewski T., Prelli F., Kascsak R., Mendez E., Harris D.A.,

Ironside J., Tagliavini F., Carp R.I., Frangione B., 2000. Reversion of prion protein conformational changes by synthetic β -sheet breaker peptides. *Lancet*, 355, 192-197.

Supattapone S., Nguyen H.B., Cohen F.E., Prusiner S.B., Scott M.R., 1999. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96, 14529-14534.

Supattapone S., Wille H., Uyechi L., Safar J., Tremblay P., Szoka F.C., Cohen F.E., Prusiner S.B., Scott M.R., 2001. Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *Journal of Virology*, 75, 3453-3461.

Supattapone S., Nishina K., Rees J.R., 2002. Pharmacological approaches to prion research. *Biochemical Pharmacology*, 63, 1383-1388.

Tagliavini F., McArthur R.A., Canciani B., Giaccone G., Porro M., Bugiani M., Lievens P.M.-J., Bugiani O., Peri E., Dall'Ara P., Rocchi M., Poli G., Forloni G., Bandiera T., Varasi M., Suarato A., Cassutti P., Cervini M.A., Lansen J., Salmons M., Post C., 1997. Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science*, 276, 1119-1122.

Tagliavini F., Forloni G., Colombo L., Rossi G., Girola L., Canciani B., Angeretti N., Giampaolo L., Peressini E., Awan T., De Gioia L., Ragg E., Bugiani O., Salmons M., 2000. Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrPSc *in vitro*. *Journal of Molecular Biology*, 300, 1309-1322.

White A.R., Enever P., Tayebi M., Mushens R., Linehan J., Brandner S., Anstee D., Collinge J., Hawke S., 2003. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature*, 422, 80-83.

Abstract

Quinacrine failure to treat prion diseases: a possible pharmacological explanation

Given the epidemiological uncertainty of the prion diseases, there is an urgent need to discover and to develop antiprion therapeutics in humans. The efficacy of candidate molecules is predominantly tested *in vitro* in neuroblastoma cells. For several molecules, including quinacrine, a discrepancy has been observed between a proven antiprion action *in vitro* and its lack of clinical efficacy in the Creutzfeldt-Jakob disease. To further investigate the possible pharmacokinetic origin of the lack of clinical efficacy of quinacrine (and then predictable), we studied the quinacrine disposition both *in vivo* and *in vitro*. Ultimately, our experiment was aimed at determining the dosage regimen, which should be administered *in vivo* to obtain efficacious concentrations in the biophase. We used a model of naturally scrapie-affected ewes. First, we performed a standard clinical trial in scrapie-affected ewes and, we confirmed the absence of therapeutic benefit of quinacrine, as previously shown in humans. In *in vitro* experiments reproducing the princeps culture conditions in which 50% of antiprion action has been observed, namely a nominal quinacrine concentration of 300 nM, we re-evaluated the EC₅₀ for the potential biophases of quinacrine effect. Quinacrine was assayed by HPLC. We

showed that the actual extracellular and intracellular quinacrine neuroblastoma concentrations were 120 nM and 3700 nM, respectively. Quinacrine concentrations in cerebrospinal fluid concentrations and brain tissue, corresponding to the extracellular and intracellular biophases respectively, were measured in healthy ewes after quinacrine administration. The cerebrospinal fluid quinacrine concentrations (< 2.1 nM and 55 nM after therapeutic and toxic quinacrine exposure, respectively) were lower than the actual quinacrine extracellular neuroblastoma concentrations corresponding to the measured EC₅₀ (120 nM). Tissue brain quinacrine concentration (1040 nM) after a therapeutic dose of quinacrine was lower than the actual active quinacrine intracellular neuroblastoma concentration (6700 nM) and, only a toxic quinacrine dose allowed to obtain efficacious quinacrine tissular concentrations (53800 nM). Finally, whatever the actual quinacrine biophase, intra- versus extracellular, efficacious quinacrine concentrations cannot be achieved *in vivo* with a safe dosage regimen. In the future, in order to avoid *in vivo* studies for which failure can be predicted, in particular in humans, it is recommended to measure the actual anti-prion EC₅₀ in the biophase *in vitro*, in order to determine if the *in vitro* anti-prion action is achievable *in vivo*.