

## Modélisation des infections virales du cerveau des équidés

Marielle Cochet 1, François Piumi 1, Gaëlle Gonzalez 1, Kamila Gorna 1, Xavier Donadeu 2, Stéphan Zientara 1, Nathalie Aulner 4, Anne Danckaert 4, Alexandra Benchoua 3, Muriel Couplier 1

<sup>1</sup> UMR 1161 Virologie INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES, Université Paris-Est, 94700, Maisons-Alfort, France.

<sup>2</sup> Division of Developmental Biology, Roslin Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, UK.

<sup>3</sup> CECS, I-STEM, AFM, 91030, Evry, France

<sup>4</sup> UTechS Photonic BioImaging/Institut Pasteur, 75724, Paris, France  
[muriel.couplier@vet-alfort.fr](mailto:muriel.couplier@vet-alfort.fr) ; [marielle.cochet@vet-alfort.fr](mailto:marielle.cochet@vet-alfort.fr)



### Ce qu'il faut retenir

Il n'existe pas de traitement pour les encéphalites virales du cheval. Notre objectif est d'identifier des molécules thérapeutiques. Pour cela, il est nécessaire de disposer de modèles *in vitro* reproduisant au mieux l'infection chez le cheval. Nous montrons ici les modèles développés et leur application.

### 1 Contexte et objectifs

Les maladies virales équinées ont un impact fort sur la santé des équidés mais aussi sur la santé humaine. Beaucoup de virus affectant les chevaux sont en effet d'importants pathogènes pour l'homme. Beaucoup ont également un fort potentiel pour s'étendre à de nouvelles aires géographiques. On parle alors de risque d'émergence. Parmi ces virus, on peut citer les *Flavivirus*, les *Togaviridae* genre *Alphavirus* ainsi que le virus Hendra ou celui de la rage. Parmi les *Flavivirus*, le virus de l'encéphalite japonaise (EJV) s'est répandu de l'Asie à l'Ouest du Pacifique et est responsable de 68 000 cas cliniques humains par an dans le monde, avec approximativement 13 000 à 20 000 morts. Des cas sporadiques chez les chevaux sont observés dans de nombreux pays dont le Japon, Hong-Kong, Taiwan, l'Inde, etc... Le virus de West Nile (WNV) appartient aussi à cette famille. Maintenant réparti sur l'ensemble des continents, il est bien implanté en Europe. En 2018, le nombre de cas a dramatiquement augmenté avec plus de 2000 cas cliniques chez l'homme dont 180 mortels et 285 cas chez les chevaux. Son aire de répartition est en expansion et on a pu observer pour la 1<sup>ère</sup>

fois son émergence en Allemagne alors qu'en France, le nombre de cas augmentait spectaculairement. Trois alphavirus, les virus des encéphalites équine de l'Est (EEEV), de l'Ouest (OEEV) et du Venezuela (VEEV) sont, comme les Flavivirus, transmis par les moustiques et responsables d'encéphalites équine et humaine. Ils sont hautement contagieux mais ne sont présents, actuellement, que sur le continent Américain. Tous ces virus ciblent le système nerveux central (SNC) et sont responsables d'encéphalites mortelles chez l'homme et le cheval. Cependant, ni la médecine humaine, ni la médecine équine ne dispose de molécules thérapeutiques pour lutter efficacement contre ces maladies. Ce constat appelle au développement, de façon urgente, de molécules antivirales qui devront à l'avenir, faire partie de l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre ces maladies.

Notre objectif est d'identifier des molécules antivirales à large spectre c'est-à-dire des molécules qui bloqueront la réplication des virus appartenant à différentes familles virales en ciblant des facteurs cellulaires communs qui sont nécessaires à leur réplication. Afin d'identifier ces molécules nous devons disposer de modèles *in vitro* pertinents qui reproduisent au mieux l'infection dans le SNC des chevaux. Nous présentons ici le développement de ces modèles équine ainsi que les outils mis en place pour identifier des molécules thérapeutiques.

## 2 Méthode

Afin de développer des modèles mimant au mieux l'infection dans le cerveau des chevaux, nous avons dérivés des cellules neurales équine à partir de cellules souches pluripotentes induites équine (EqiPSC). Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont depuis quelques années très utilisées pour modéliser des maladies. Elles permettent de mieux les comprendre et de tester des molécules thérapeutiques.

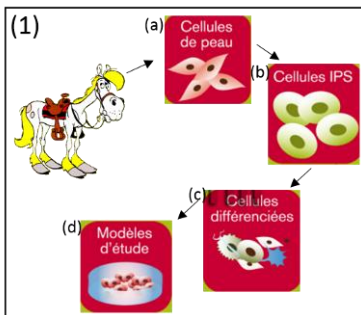


Figure I. Les iPSCs sont obtenues à partir de cellules

Les cellules de la peau adultes spécialisées (a) qui sont génétiquement modifiées pour redevenir immatures (b) (elles sont alors semblables à des cellules souches embryonnaires). Elles sont ensuite « re-différenciées » en cellules spécialisées : les cellules du système nerveux central ou cellules progénitrices neurales équine (EqNPCs) (c) qui sont ensuite utilisées comme modèle d'étude (d).

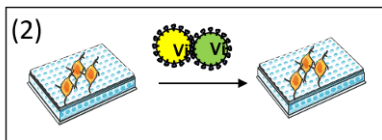


Figure II. Les eqNPCs sont infectées par nos virus d'intérêt : les virus de West Nile (WNV) et de l'encéphalite équine de l'est (EEEV)

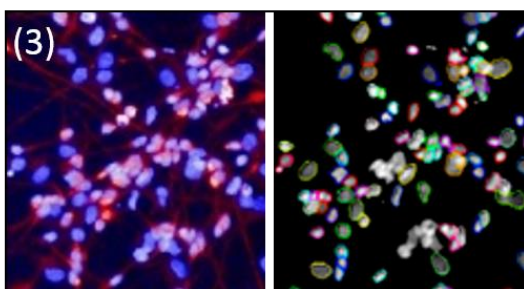


Figure III. Nous utilisons des systèmes d'imagerie à haut débit (OPERA, Perkin Elmer) pour quantifier l'infection et le taux de survie cellulaire (cytotoxicité).

Un masque (photo de droite) appliqué à chaque cellule, ou chaque cellule infectée, permet leur quantification.

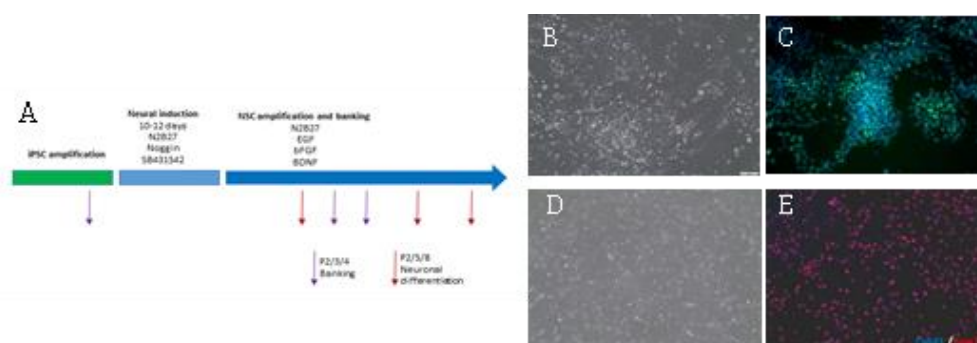
Ce système permet d'identifier rapidement des molécules qui ont une activité antivirale contre le virus d'intérêt, tout en étant non cytotoxiques.

## 3 Résultats

### 3.1 Obtention du modèle d'étude *in vitro* : dérivation des cellules progénitrices neurales équine (EqNPCs) à partir des cellules souches pluripotentes induites (EqiPSCs).

Les Eq iPSCs (gracieusement fournies par le Dr X Donadeu, Roslin Institute, Glasgow), ont été amplifiées (Figure IV A, vert) puis induite dans la voie neurale (Figure IV A, bleu clair) pour obtenir des EqNPCs. Leur capacité à se différencier en neurones a été vérifiée. Les NPCs ont ensuite été amplifiées et « banquées » pour être utilisées dans les expériences suivantes.

Figure IV. Résumé des étapes de différenciation des iPSC équine en progéniteurs neuraux (Eq NPCs). (A) Schéma récapitulatif. B-C/ iPSCs en culture sur cellules nourricières. Contraste de phase (B) et Immuno-marquage avec un anticorps dirigé contre Oct3/4, des marqueurs de la pluripotence (C). D-E/ NPCs équine après induction neurale. Contraste de phase (D) et anti-Sox2, marqueur des NPCs (E).



### 3.2 Modèle d'infection des EqNPCs par WNV

Les EqNPCs ont été infectées par le WNV (souche NY99) à une multiplicité d'infection de 0.01 (0.01 particules virales infectieuses par cellule) pendant 24, 48, 72 et 96 heures. Les cellules sont détectées et comptées grâce à une coloration bleue spécifique des noyaux (Figure V A). L'infection est révélée grâce à un marquage spécifique de l'enveloppe de notre virus (Figure V A, rouge). Les quantifications par imagerie cellulaire (OPERA) révèlent une augmentation du nombre de cellules infectées au cours du temps (Figure V B) et une réduction du nombre de cellules totales à partir de 72 hpi (heures post-infection) (Figure V C). Les techniques de virologie classique valident les résultats obtenus en imagerie cellulaire. Les mêmes cinétiques d'infection sont en effet observées lorsque le génome (Figure V D) et les particules (Figures V E) virales sont quantifiés.

### 3.3 Modèle d'infection des EqNPCs par EEEV

Les EqNPCs ont été infectées par EEEV à une multiplicité d'infection de 0.0001 (0.0001 particules virales infectieuses par cellule). EEEV est très cytopathique pour les EqNPCs. Un marquage des noyaux des cellules (DAPI) permet de révéler une diminution de 72% de la survie des cellules à 48 hpi (figure VI A et B). Dans le cas de ce virus, nous n'évaluerons pas l'effet de molécules antivirales en quantifiant le pourcentage de cellules infectées mais en quantifiant le nombre de cellules survivantes.

### 3.4 Conclusions

Nous avons mis en place deux modèles d'infection des cellules neurales progénitrices équine par des virus responsables d'encéphalites équine : WNV et EEEV. Les doses de virus (MOI) et point de cinétique pertinents pour tester des molécules antivirales ont été identifiées. Notre prochaine étape est de tester l'activité antivirale de molécules sélectionnées. Leur cytotoxicité sera également évaluée.

## 4 Applications pratiques

Le développement de ces modèles équine, standardisés, et utilisant de l'imagerie à haut débit permettra <sup>1/</sup> de tester l'activité de molécules antivirales contre l'un et l'autre de ces virus ainsi que leur cytotoxicité pour les cellules de l'organe naturellement cible de l'infection (le cerveau des chevaux) et <sup>2/</sup> de cribler, rapidement et à faible coût, des banques de petites molécules. Ceci permettra l'identification de molécules antivirales à large spectre : des molécules capables d'inhiber la réplication de virus appartenant à différentes familles virales.

Des brevets seront déposés pour ces molécules et des contacts seront pris avec l'industrie du médicament de façon à poursuivre leur développement pour, à termes, être en mesure de proposer aux vétérinaires et propriétaires de chevaux de nouvelles molécules thérapeutiques pour traiter les encéphalites virales chez les équidés.

Figure V. Infection des EqNPCs par le WNV. (A) Photos prises sur OPERA 10x (Perkin Elmer). (B) quantification des cellules infectées. (C) quantification du nombre de cellules totales. (D) Quantification du génome viral. (E) Quantification du titre viral par TCID<sub>50</sub>.

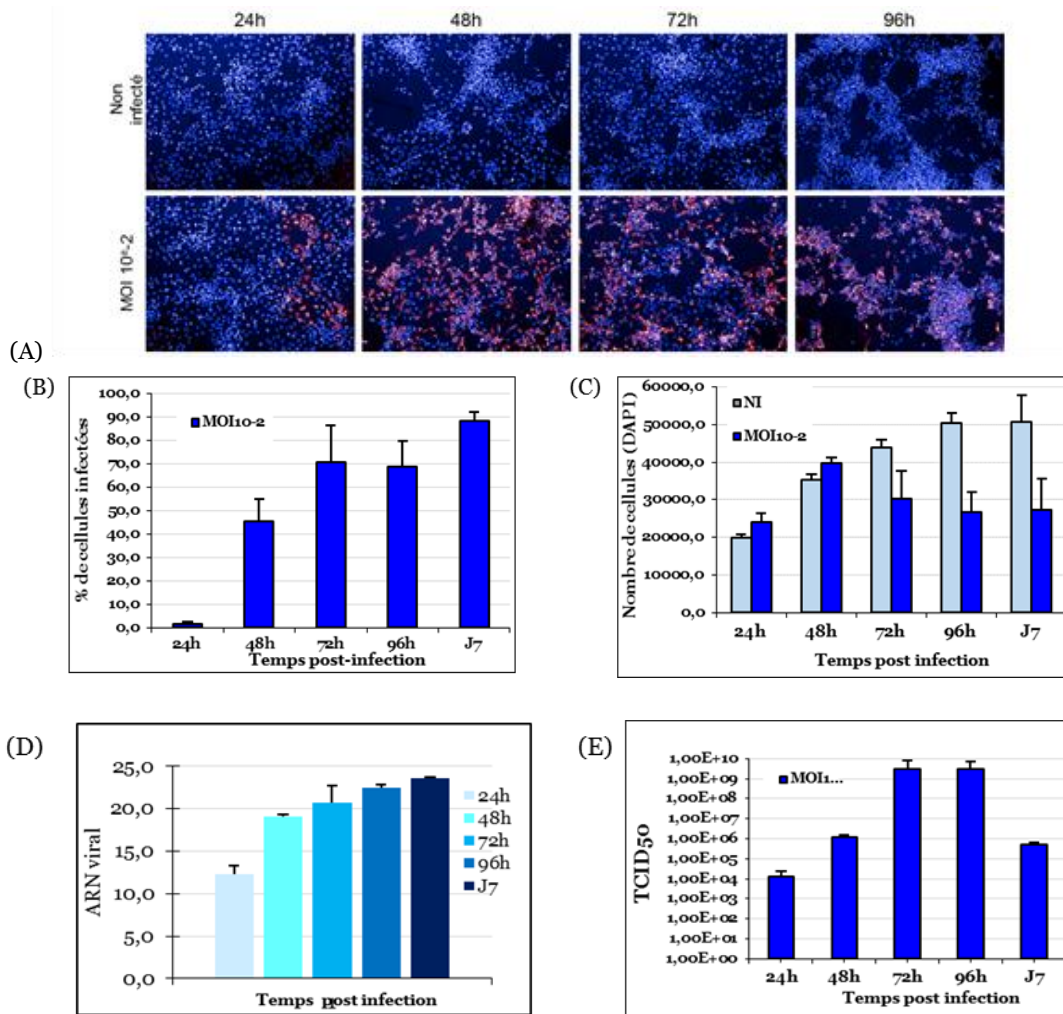


Figure VI. Infection des EqNPCs par EEEV. (A) Photos prises sur OPERA 10x (Perkin Elmer). (B) quantification du nombre de cellules totales.



## 5 Perspectives

Nos modèles d'infection étant mis en place, nous testerons/criblerons des banques de molécules pour leur activité antivirale. Ces activités seront réalisées dans le cadre du projet SAVE financé par l'IFCE.

Nous avons, en parallèle de ce projet, développé un projet très similaire où des cellules du système nerveux central humain sont utilisées. Les résultats obtenus avec les deux systèmes cellulaires (infection par les mêmes virus) nous permettent d'espérer identifier des molécules antivirales actives et non cytotoxiques pour les deux espèces. Nous espérons que ceci potentialisera les possibilités de débouchés auprès de l'industrie pharmaceutique, permettant ainsi l'arrivée de molécules thérapeutiques importantes aussi bien pour la santé des équidés que pour la santé humaine.