



Le ganciclovir, pour traiter la rhinopneumonie demain ?

Côme Thieulent^{1,2}, Erika Hue^{1,2}, Christine Fortier^{1,2}, Patrick Dallemagne³, Stephan Zientara⁴, Aymeric Hans⁵, Hélène Munier-Lehmann⁶, Pierre-Olivier Vidalain⁷ et Stéphane Pronost^{1,2}

¹ LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France.

² Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450, 14280 Saint-Contest, France.

³ Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ, UNICAEN, CERMN EA4258, 14000 Caen, France.

⁴ UMR BIPAR ANSES, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est Laboratoire ANSES de santé animale, site de Maisons-Alfort, France.

⁵ Unité PhEED, ANSES, Laboratoire ANSES de santé animale, site de Normandie, France.

⁶ Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, CNRS UMR 3523, 75015 Paris, France.

⁷ Equipe Chimie et Biologie, Modélisation et Immunologie pour la Thérapie (CBMIT), Université Paris Descartes, CNRS UMR 8601, 75006 Paris, France.

come.thieulent@laboratoire-labeo.fr



<https://www.vetocast.com>

Cheval infecté par l'HVE-1 ou l'HVE-4 montrant des problèmes respiratoires.



<https://pmbioy.com>

Cheval ne présentant plus de symptômes.

Ce qu'il faut retenir

Les herpesvirus équin 1 et 4 sont indéniablement des virus responsables de pertes économiques importantes pour les acteurs de la filière équine. Ces virus sont responsables de la rhinopneumonie équine, qui se caractérise par des problèmes respiratoires, des avortements et des troubles nerveux. À ce jour, la vaccination reste le meilleur moyen de lutte contre cette maladie. Il n'existe cependant pas de traitement antiviral spécifique efficace contre la rhinopneumonie équine. Durant notre étude, nous avons évalué l'effet de 1200 molécules issues d'utilisations en médecine humaine contre l'HVE-1. Nous avons identifié le ganciclovir comme étant la molécule la plus efficace contre l'HVE-1. Le ganciclovir permet d'empêcher la réplication de l'HVE-1 dès 5 µg/mL et montre, *in vitro*, une concentration efficace 10 fois supérieure à celle de l'aciclovir, qui est actuellement la seule molécule à avoir été utilisée sur le terrain pour soigner les formes graves de la rhinopneumonie. L'effet antiviral du ganciclovir a été confirmé sur des souches isolées sur le terrain et contre une souche d'HVE-4. Cette étude a permis de mettre en évidence le très bon effet antiviral du ganciclovir contre les HVE-1 et HVE-4 en conditions de laboratoire.

1 Contexte et objectifs

Les herpesvirus équin 1 (HVE-1) et 4 (HVE-4) sont les deux virus responsables de la rhinopneumonie équine. Ces virus sont particulièrement virulents, comme en atteste la crise de rhinopneumonie de 2018 en France durant laquelle plus de 74 foyers infectieux ont été déclarés au RESPE (Réseau d'épidémiologie et de surveillance en pathologie équine) conduisant à l'annulation de plus de 210 compétitions équestres. Les HVE-1 et HVE-4 sont responsables principalement de maladies respiratoires, caractérisées par de la toux, de la fièvre et des écoulements nasaux. L'HVE-1 peut induire deux formes secondaires graves que sont la forme

abortive et la forme nerveuse. La forme abortive se caractérise par l'avortement du fœtus principalement dans le dernier trimestre de la gestation ou par la mort néo-natale du jeune poulain. La forme nerveuse, également appelée myéloencéphalopathie équine, provoque des symptômes allant de simple troubles de la locomotion ou d'incontinence urinaire jusqu'à une paralysie totale de l'animal conduisant dans la majorité des cas à son euthanasie. L'HVE-4 est quant à lui principalement responsable de troubles respiratoires. Les avortements à HVE-4 interviennent de manière sporadique et l'implication de ce virus dans les formes nerveuses bien que fortement suspectée reste à démontrer.

La rhinopneumonie est une des principales causes des pertes économiques pour la filière équine dans tous les pays du monde. L'avortement à HVE-1 demeure la première cause infectieuse d'avortement même si les « abortion storms » décrits dans les années 1980 ont heureusement disparu en lien avec les moyens de lutte mis en place. Ces moyens de lutte reposent principalement sur la prophylaxie avec la vaccination et la mise en place de mesures sanitaires adaptées (<https://respe.net/prevention/fiche-technique-confirmation-dune-maladie/>). La vaccination contre ces virus est indispensable car elle permet d'atténuer les problèmes respiratoires et la dissémination du virus. Cependant les vaccins disponibles ne préviennent pas suffisamment les avortements et n'ont aucun effet contre la forme nerveuse.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement spécifique pour soigner les chevaux infectés par ces virus car aucune molécule ne possède d'autorisation de mise sur le marché en santé équine contre les herpèsvirus et ce malgré des besoins importants.

L'aciclovir est une molécule antivirale largement utilisée en santé humaine contre de nombreux herpèsvirus. Plusieurs études ont néanmoins démontré que cette molécule avait un bon effet antiviral en condition de laboratoire contre l'HVE-1 et des effets moindres contre l'HVE-4. C'est à l'heure actuelle la seule molécule ayant fait l'objet d'études expérimentales sur des chevaux infectés par l'HVE-1. Bien que les données de pharmacocinétique soient satisfaisantes, les deux infections expérimentales réalisées n'ont pas donné de résultats très probants.

Dans ce contexte, notre équipe a cherché à repositionner des molécules, capables de lutter contre les HVE-1 et HVE-4. Nous avons mis en place dans notre laboratoire un modèle de culture de cellules équine sensible à ces deux virus et nous l'avons couplé à une technologie de pointe : la technologie xCELLigence® (1). Cette technologie est capable de suivre en temps réel l'infection de nos cellules par ces virus et nous a permis de réaliser un criblage à haut débit de 1200 molécules contre l'HVE-1. Notre étude vise à identifier une nouvelle molécule antivirale à fort potentielle pour traiter les myéloencéphalites équines demain.

2 Méthode

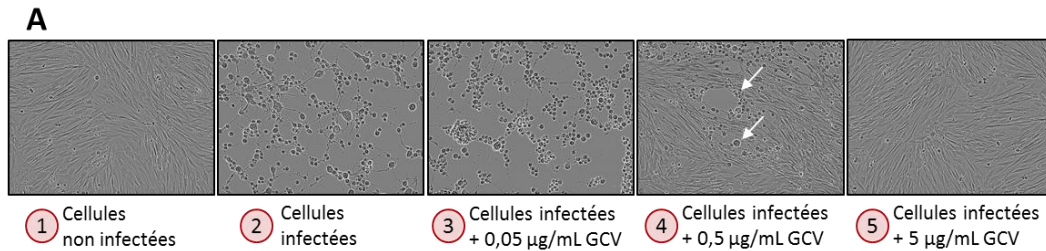
Les cellules utilisées lors de cette étude sont des cellules équines dermiques (E. Derms cells ; NBL-6, ATCC®). Le criblage des 1200 molécules provenant de la chimiothèque Prestwick® a été réalisé à 10 µg/mL sur la souche de référence HVE-1 KyD (ATCC® VR700™) avec l'appareil xCELLigence® RTCA MP system (ACEA Biosciences). Les souches d'HVE-1 FR-6815 (isolée d'un fœtus avorté en 2013) et FR-38991 (isolée d'un cheval présentant des troubles nerveux en 2009) ainsi que la souche d'HVE-4 405/76 (ATCC® VR-2230™) ont été utilisées pour confirmer l'effet de la molécule retenue. Les résultats obtenus avec la technologie xCELLigence sont confirmés par microscopie et par quantification du nombre de copies d'ADN viral dans le surnageant par amplification génique (qPCR).

3 Résultats

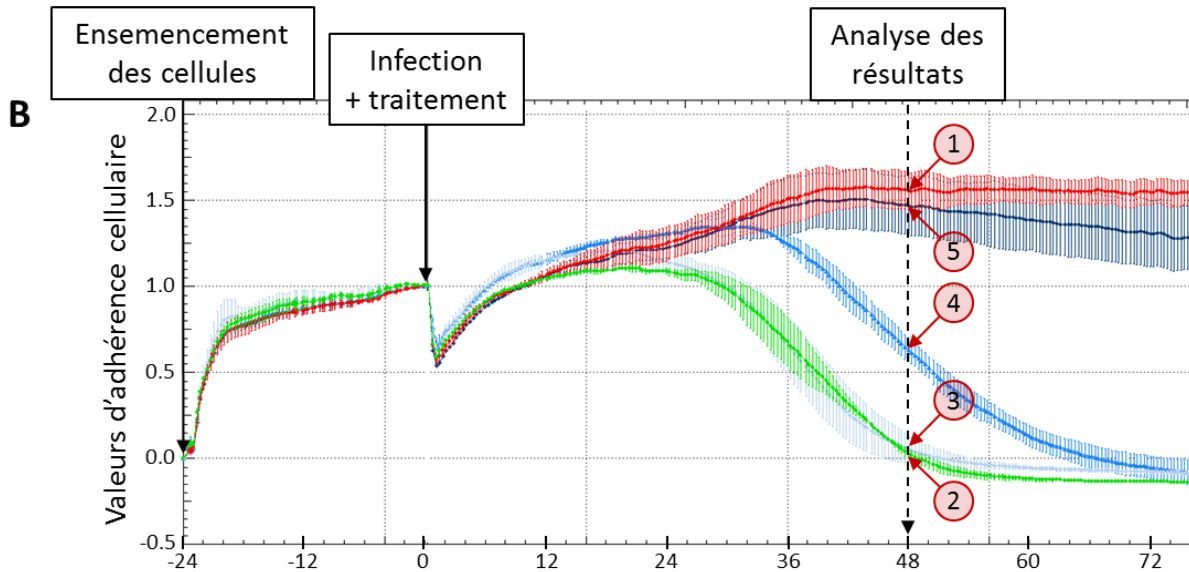
3.1 Identification du ganciclovir comme molécule antivirale contre l'HVE-1 suite au criblage d'une banque de 1200 molécules contre l'HVE-1.

Le criblage à l'aveugle de la chimiothèque Prestwick® a été réalisé grâce à la technologie xCELLigence. Il s'agit d'une banque regroupant 1200 molécules utilisées en santé humaine. Parmi les molécules montrant de potentiels effets antiviraux contre l'HVE-1, nous avons identifié le ganciclovir que nous avons testé à différentes concentrations (figure I). Les résultats montrent qu'une concentration de 5 µg/mL permet d'empêcher la réplication de l'HVE-1 sur notre modèle cellulaire et donc de maintenir le tapis cellulaire sain. Une concentration de 0.5 µg/mL retarde l'apparition d'effets cytopathiques induits par l'HVE-1 tandis qu'une concentration de 0.05 µg/mL n'a aucun effet antiviral.

Figure I : Effet antiviral du ganciclovir contre l'HVE-1



(A) Observations au microscope de l'infection des cellules équiniques dermiques par l'HVE-1 et traitées ou non avec différentes concentrations de ganciclovir (0.05 µg/mL, 0.5 µg/mL et 5 µg/mL). Les flèches blanches indiquent les altérations morphologiques des cellules équiniques dermiques infectées par l'HVE-1, également appelés effets cytopathiques (échelle : 100 µm).



(B) Suivi en temps réel par la technologie xCELLigence des cellules équiniques dermiques infectées par l'HVE-1 en présence de ganciclovir. La courbe verte représente le niveau d'adhérence au cours du temps des cellules non infectées et non traitées, la courbe rouge représente le niveau d'adhérence au cours du temps des cellules infectées par l'HVE-1 et non traitées et les courbes en dégradé de bleu représentent le niveau d'adhérence au cours du temps des cellules infectées par l'HVE-1 et traitées avec des concentrations croissantes de ganciclovir (0.05, 0.5 et 5 µg/mL).

3.2 Validation de l'effet antiviral du ganciclovir contre 3 souches d'HVE-1

Dans le but de confirmer l'effet antiviral du ganciclovir contre l'HVE-1 nous avons testé son efficacité contre 3 souches d'HVE-1. L'effet de l'aciclovir a également été évalué sur ces souches comme contrôle positif. Les EC₅₀, c'est-à-dire les concentrations capables d'inhiber 50% de la réplication virale ont été déterminées contre ces souches d'HVE-1 et les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Que ce soit pour l'aciclovir ou pour le ganciclovir, aucune différence de sensibilité n'est observée entre les 3 souches d'HVE-1 étudiées. Le ganciclovir permet d'obtenir des effets comparables à l'aciclovir mais à des concentrations 10 fois plus faibles

Tableau 1 : Sensibilité de 3 souches d'HVE-1 à des traitements à l'aciclovir et au ganciclovir

Souches d'HVE-1	Aciclovir		Ganciclovir	
	xCELLigence	qPCR	xCELLigence	qPCR
KyD	9.88	2.50	0.62	0.07
FR-6815	10.67	2.13	1.32	0.29
FR-38991	10.30	2.22	1.11	0.29

Sensibilité de 3 souches d'HVE-1 à des traitements à l'aciclovir et au ganciclovir mesuré par xCELLigence et par qPCR à 48 heures post-infection. Les résultats représentent la moyenne des concentrations efficaces médianes (EC₅₀) de 4 expériences indépendantes.

3.3 Validation de l'effet antiviral du ganciclovir contre l'HVE-4

Après avoir démontré que le ganciclovir avait un très bon effet antiviral contre l'HVE-1, nous avons évalué son effet contre l'HVE-4 et les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Les résultats obtenus par xCELLigence et par qPCR montrent que l'HVE-4 est moins sensible au ganciclovir que l'HVE-1. Le ganciclovir permet également d'obtenir des effets comparables à l'aciclovir contre l'HVE-4 mais à des concentrations 6 à 7 fois plus faibles.

Tableau 2 : Susceptibilité de l'HVE-4 à des traitements par l'aciclovir et le ganciclovir

	Aciclovir		Ganciclovir	
	xCELLigence	qPCR	xCELLigence	qPCR
HVE4 405/76	17.38	2.83	2.79	0.36

Susceptibilité de l'HVE-4 à des traitements par l'aciclovir et le ganciclovir mesuré par xCELLigence et par qPCR à 48 heures post-infection. Les résultats représentent la moyenne des concentrations efficaces médianes (EC₅₀) de 3 expériences indépendantes.

4 Applications pratiques

Cette étude *in vitro* est une première étape encourageante qui devra être confirmée *in vivo* afin de mettre à la disposition de la filière un traitement efficace capable de réduire les symptômes provoqués par les formes graves induites par les HVE-1 et 4 et également d'empêcher la transmission de ces virus de l'individu infecté à un autre.

5 Perspectives

Une étude de pharmacocinétique (étude du devenir d'une molécule après son administration dans l'organisme) du ganciclovir a déjà été réalisée chez le cheval (2). L'administration par voie intraveineuse du ganciclovir et de sa pro-drogue le valganciclovir, par voie orale permettent de maintenir une concentration plasmatique de ganciclovir à un seuil comparable aux concentrations utilisées *in vitro*. A la vue de l'effet antiviral du ganciclovir contre les HVE-1 et HVE-4, avec notamment des effets comparables à l'aciclovir mais à des concentrations 10 fois plus faibles, nous envisageons de faire une étude expérimentale sur des chevaux infectés par l'HVE-1 pour mesurer les effets du ganciclovir. Cette étude *in vivo*, permettrait de confirmer l'effet antiviral du ganciclovir observé en conditions de laboratoire.

Ces travaux ont été financés par l'IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation), les Fonds Eperon, la région Normandie et le CPER 2015-2020 _CENTAURE PREACH diagnostic, traitement, PREvention des Affections locomotrices et cardio-respiratoires touchant les Chevaux, sources d'innovation pour la santé de l'Homme est cofinancée par l'Union européenne dans le cadre du programme opérationnel FEDER/FSE 2014-2020.

6 Références

(1) Thieulent, C., Hue, E., Fortier, C., Dallemagne, P., Zientara, S., Hans, A., Munier-Lehmann, H., Vidalain, P.-O., Pronost, S. 2019. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology* 526, 105-116.

(2) Carmichael, R., Whitfield, C., Maxwell, L. 2013. Pharmacokinetics of ganciclovir and valganciclovir in the adult horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36 (5), 441-449.