



Côme Thieulent

Côme Thieulent a obtenu son master Biosciences, spécialité Microbiologie en 2016 au sein de l'Université de Caen Normandie. Il est maintenant doctorant en 3^{ème} année au sein de LABÉO et de l'unité BIOTARGEN de Normandie Université. Son projet de thèse vise à développer un traitement efficace pour lutter contre l'herpèsvirus équin-1.

come.thieulent@laboratoire-labeo.fr

Partenaire(s)



Financier(s)



Un nouvel arsenal thérapeutique contre la rhinopneumonie équine

Côme Thieulent^{1,2}, Erika Hue^{1,2,3}, Christine Fortier^{1,2,3}, Patrick Dallemagne⁴, Stephan Zientara⁵, Aymeric Hans⁶, Hélène Munier-Lehmann⁷, Pierre-Olivier Vidalain⁸ et Stéphane Pronost^{1,2,3}

¹LABÉO

²Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450

³Normandie Univ, UNICAEN, ImpedanCELL

⁴Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ, UNICAEN, CERMN EA4258

⁵UMR BIPAR ANSES, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris-Est Laboratoire ANSES de santé animale, site de Maisons-Alfort

⁶Unité PHEED, ANSES, Laboratoire ANSES de santé animale, site de Normandie

⁷Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, CNRS UMR 3523

⁸Equipe Biologie Cellulaire des Infections Virales, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR 5308, Université Lyon 1

Type de présentation : communication orale

Ce qu'il faut retenir

L'herpèsvirus équin 1 (HVE-1) est l'un des deux agents responsables de la rhinopneumonie équine. Ce virus peut provoquer des troubles respiratoires, des avortements, une mort néonatale du jeune poulain et des troubles nerveux appelés myéloencéphalopathie équine. Les vaccins existant à l'heure actuelle permettent de réduire les problèmes respiratoires et donc la dissémination du virus. Cependant, ils ne préviennent pas suffisamment les formes graves de la maladie. Par ailleurs, aucune molécule antivirale ne possède d'autorisation de mise sur le marché en santé équine en France.

Nous avons développé un système permettant de tester à haut débit un grand nombre de molécules contre l'HVE-1 en conditions de laboratoire. Parmi les 3000 molécules testées, 23 ont été identifiées comme potentiellement efficaces contre ce virus. Le ganciclovir et sa pro-drogue le valganciclovir se sont montrés parmi les molécules les plus efficaces contre l'HVE-1.

Ces résultats encourageants, couplés aux données de pharmacocinétique déjà existantes de ces molécules sur le modèle équin nous ont conduits à envisager une étude expérimentale sur des poneys.



<https://www.vetostore.com>

Cheval infecté par l'HVE-1 présentant des troubles respiratoires.

Traitement au
(val)ganciclovir



<https://pibaabj.com>

Cheval ne présentant plus de symptômes.

1 Contexte et objectifs

Les herpèsvirus équins 1 (HVE-1) et 4 (HVE-4) sont les deux virus responsables de la rhinopneumonie équine. Ces deux virus sont particulièrement virulents, comme en atteste l'épizootie de 2018 en France où plus de 74 foyers infectieux ont été déclarés au RESPE (Réseau d'épidémiologie-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 de l'écoulement nasal. L'HVE-1 peut induire deux formes secondaires graves que sont la forme abortive et la forme nerveuse. L'avortement du fœtus intervient principalement au cours des quatre derniers mois de gestation mais la mort néo-natale du jeune poulain suite à l'infection à HVE-1 est parfois observée. La forme nerveuse, également appelée myéloencéphalopathie équine, provoque des symptômes allant de simples troubles de la locomotion à une paralysie totale de l'animal conduisant dans la majorité des cas à l'euthanasie. L'HVE-4 est principalement responsable de troubles respiratoires. Les avortements à HVE-4 interviennent de manière sporadique et l'implication de ce virus dans les formes nerveuses reste à démontrer, bien que fortement suspectée.

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-confir-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 démontré 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 en France et ce malgré des besoins importants.

L'aciclovir est une molécule antivirale largement utilisée en santé humaine contre plusieurs herpèsvirus. Des études ont par ailleurs démontré que cette molécule avait un effet antiviral significatif en condition de laboratoire contre l'HVE-1^(1,2) et des effets moindres contre l'HVE-4^(2,3). Il s'agit à l'heure actuelle de la seule molécule ayant fait l'objet d'études expérimentales sur des chevaux infectés par l'HVE-1^(4,5). Cependant les résultats obtenus ne permettent pas de conclure à une réelle efficacité de cette molécule *in vivo*.

Nous avons, au sein de notre équipe, développé un système permettant de tester *in vitro* un grand nombre de molécules contre l'HVE-1 afin d'identifier de nouvelles molécules ou de repositionner des molécules déjà existantes présentant une efficacité contre les HVE-1.

2 Méthodes

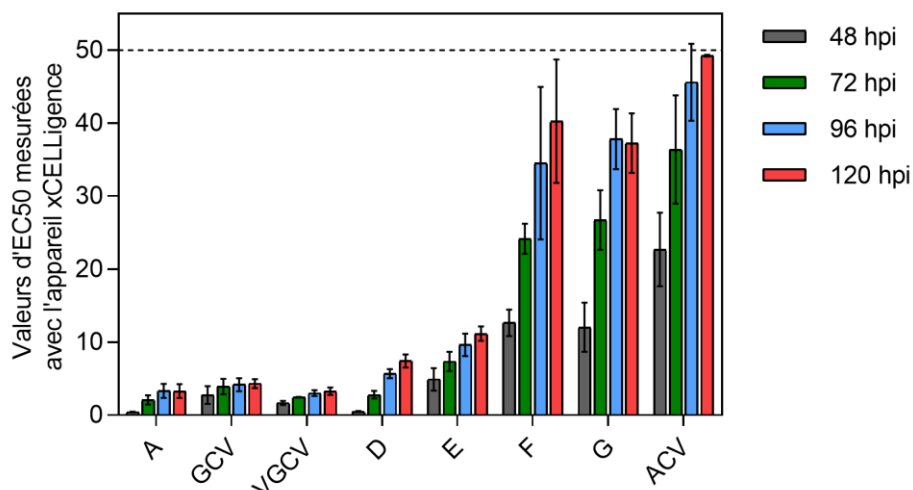
Lors de cette étude nous avons utilisé des cellules dermiques équines (E. Derm), des cellules rénales de lapin (RK13) et des cellules rénales d'embryons équins (EEK). Le criblage des molécules a été réalisé à 10 µg/ml ou 10 µM avec la technologie xCELLigence® RTCA MP system (ACEA Biosciences). Cet appareil permet un suivi en temps réel de l'adhérence des cellules et donc un suivi de la destruction du tapis cellulaire provoqué par le virus. Trois souches d'HVE-1 ont été utilisées lors de cette étude : la souche de référence KyD (ATCC®, VR-700) la souche FR-6815 (isolée à partir d'un fœtus avorté en 2013 en France) et la souche FR-38991 (isolée sur un cheval présentant des troubles nerveux en 2009 en France). Les résultats obtenus avec la technologie xCELLigence ont tous été confirmés par quantification du nombre de copies d'ADN viral dans le surnageant par PCR quantitative (qPCR) et par microscopie.

3 Résultats

3.1 Criblage des molécules et sélection des molécules d'intérêt

Toutes les molécules ont été testées à l'aveugle sur cellules E. Derm et contre la souche de référence KyD. La banque de molécules utilisée est constituée de la chimiothèque Prestwick® (environ 1200 molécules), d'une partie de la chimiothèque du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN ; environ 1600 molécules) et d'une banque de molécules sélectionnées par notre laboratoire (environ 40 molécules). Parmi toutes ces molécules, 23 ont montré un effet antiviral dans notre modèle. L'efficacité de ces 23 molécules ainsi que l'absence de toxicité ont ensuite été évaluées par dose-réponse (résultats non présentés). Par la suite, nous avons sélectionné les 8 meilleurs candidats sur la base des critères suivants : 1) capacité à inhiber totalement la réplication virale à forte concentration, 2) concentration efficace médiane (EC₅₀) inférieure à 50 µM au cours du temps et 3) absence de toxicité sur les cellules E. Derm à 50 µM. Parmi les molécules sélectionnées, nous retrouvons l'aciclovir, le ganciclovir et le valganciclovir (figure 1). Les autres composés sont notés A, D, E, F et G et font l'objet à cette date d'accords de confidentialité.

Figure 1 : Effet antiviral contre l'HVE-1 des huit molécules retenues, mesuré par xCELLigence au cours du temps.



3.2 Confirmation de l'effet des huit candidats

Les molécules retenues ont ensuite été testées en dose réponse (0,4 μM – 50 μM) contre différentes souches de virus (KyD, FR6815 et FR_38991) sur différents modèles cellulaires (cellules RK13 et EEK) (Tableau 1). La molécule G n'a montré aucun effet antiviral sur ces modèles cellulaires. Les autres molécules ont toutes démontré un effet avec des valeurs d' EC_{50} allant de 0.6 μM à 16.2 μM à l'exception de l'aciclovir qui a présenté des valeurs d' EC_{50} allant de 14.2 μM à >50 μM .

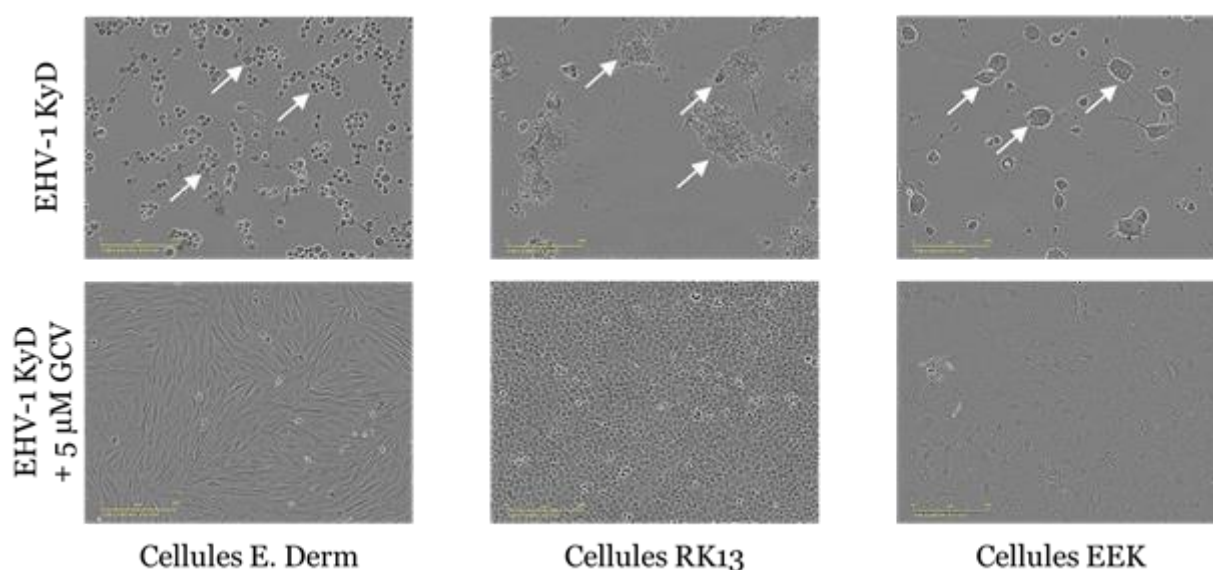
Tableau 1 : Mesure de l'effet antiviral par qPCR des 8 candidats contre 3 souches d'HVE-1.

| Valeurs d' EC_{50} mesurées par qPCR (Ecart-type) en μM | | | | |
|---|------------|------------|------------|-------------|
| Cellules | RK13 | EEK | EEK | EEK |
| Virus | KyD | KyD | FR-6815 | FR-38991 |
| A | 0,9 (0,1) | 3,1 (0,4) | 1,6 (0,1) | 2,8 (1,6) |
| GCV | 0,6 (0,2) | 1,1 (0,1) | 0,8 (0,4) | 0,7 (0,4) |
| VGCV | 1,0 (0,2) | 1,8 (0,3) | 1,2 (0,6) | 1,1 (0,5) |
| D | 12,6 (2,2) | 8,7 (3,4) | 2,4 (0,6) | 5,8 (2,5) |
| E | 9,3 (1,7) | 16,2 (1,2) | 2,1 (0,6) | 5,7 (1,2) |
| F | 10,1 (2,3) | 11,4 (1,4) | 0,9 (0,1) | 2,7 (0,1) |
| G | >50 | >50 | >50 | >50 |
| ACV | 31,0 (9,3) | >50 | 14,2 (5,3) | 36,0 (11,0) |

Sensibilité de 3 souches d'HVE-1 à différents traitements mesurés par qPCR à 48 heures post-infection. Les résultats représentent la moyenne des concentrations efficaces médianes (EC_{50}) mesurées par qPCR de 3 expériences indépendantes.

Aucune des molécules testées n'a présenté de toxicité sur ces deux modèles cellulaires aux concentrations testées (données non présentées). L'aciclovir n'a pas été retenu pour la suite de l'étude car il présentait une efficacité trop faible sur les cellules EEK. La molécule G a également été écartée de la liste des candidats potentiels pour un traitement contre l'HVE-1 car elle ne présente pas d'effet antiviral sur les modèles cellulaires RK13 et EEK. Parmi les autres molécules d'intérêt, le ganciclovir ainsi que sa pro-drogue le valganciclovir sont les molécules présentant les meilleures efficacités quels que soient les modèles cellulaires et les souches utilisées. Par ailleurs ces molécules sont capables d'inhiber totalement la destruction du tapis cellulaire provoquée par l'HVE-1 dès 5 μM (figure 2).

Figure 2 : Observation au microscope de l'effet antiviral du ganciclovir contre l'HVE-1.



Observation au microscope de l'infection des cellules E. Derm, RK13 et EEK par la souche EHV-1 KyD après traitement ou non avec 5 µM de ganciclovir. Les photos ont été prises 48 heures post-infection. Les flèches blanches indiquent les altérations morphologiques des cellules provoquées par l'HVE-1, également appelé effet cytopathique (échelle : 200 µm).

4 Conclusions et applications pratiques

Cette étude a permis de mettre en évidence un grand nombre de molécules efficaces *in vitro* contre l'HVE-1. Parmi toutes ces molécules, 6 candidats ont été retenus pour leur forte efficacité contre l'HVE-1 et l'absence de toxicité sur différents modèles cellulaires. L'aciclovir qui correspond à la molécule la plus étudiée contre ce virus dans la littérature et qui a déjà fait l'objet de deux études expérimentales sur des chevaux n'a montré qu'une très faible efficacité sur les cellules EEK en comparaison aux autres molécules. Sa faible efficacité *in vitro* pourrait expliquer les résultats controversés obtenus *in vivo* précédemment.

Parmi les 6 molécules intéressantes, le ganciclovir et sa pro-drogue le valganciclovir sont parmi les molécules qui présentent la plus grande efficacité dans toutes nos conditions expérimentales. Suite à cette étude, nous évaluerons l'effet antiviral du ganciclovir sur un modèle *ex vivo* de trachée équine afin de confirmer les résultats observés sur modèle cellulaire en monocouche. L'utilisation d'un modèle 3D constitue une étape importante pour valider l'effet de nos molécules d'intérêt avant d'envisager des études *in vivo*. Par ailleurs une étude de pharmacocinétique du ganciclovir et du valganciclovir a déjà été réalisée chez le cheval (6). L'administration par voie intraveineuse du ganciclovir et du valganciclovir par voie orale permet de maintenir une concentration plasmatique de ganciclovir à un seuil comparable à celui des concentrations utilisées *in vitro*. Ces résultats encourageants constituent une première étape nécessaire avant la réalisation d'une étude *in vivo* de l'effet du ganciclovir sur l'infection à HVE-1.

5 Pour en savoir plus

- (1) Garre, B.; Vandermeulen, K.; Nugent, J.; Neyts, J.; Croubels, S.; Debacker, P.; Nauwynck, H. In Vitro Susceptibility of Six Isolates of Equine Herpesvirus 1 to Acyclovir, Ganciclovir, Cidofovir, Adefovir, PMEDAP and Foscarnet. *Vet. Microbiol.* 2007, 122 (1–2), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.004>.
- (2) Thieulent, C. J.; Hue, E. S.; Fortier, C. I.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Fortier, G. D.; Pitel, P.-H.; Vidalain, P.-O.; Pronost, S. L. Screening and Evaluation of Antiviral Compounds against Equid Alpha-Herpesviruses Using an Impedance-Based Cellular Assay. *Virology* 2019, 526, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.013>.
- (3) Azab, W.; Tsujimura, K.; Kato, K.; Arii, J.; Morimoto, T.; Kawaguchi, Y.; Tohya, Y.; Matsumura, T.; Akashi, H. Characterization of a Thymidine Kinase-Deficient Mutant of Equine Herpesvirus 4 and in Vitro Susceptibility of the Virus to Antiviral Agents. *Antiviral Res.* 2010, 85 (2), 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.007>.
- (4) Garre, B.; Gryspeerdt, A.; Croubels, S.; De Backer, P.; Nauwynck, H. Evaluation of Orally Administered Valacyclovir in Experimentally EHV1-Infected Ponies. *Vet. Microbiol.* 2009, 135 (3–4), 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.062>.
- (5) Maxwell. Efficacy of the Early Administration of Valacyclovir Hydrochloride for the Treatment of Neuropathogenic Equine Herpesvirus Type-1 Infection in Horses. 2017.
- (6) Carmichael, R. J.; Whitfield, C.; Maxwell, L. K. Pharmacokinetics of Ganciclovir and Valganciclovir in the Adult Horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2013, 36 (5), 441–449. <https://doi.org/10.1111/jvp.12029>.