

JOURNÉES SCIENCES & INNOVATIONS ÉQUINES

20 ET 21 MAI 2021



www.ifce.fr



Thieulent Côme

Traitement au valganciclovir des infections à herpèsvirus équin 1

Côme Thieulent a obtenu son doctorat de sciences en décembre 2020 au sein de LABÉO et de l'unité BIOTARGEN de Normandie Université. Son projet de thèse visait à rechercher un traitement efficace pour lutter contre l'herpèsvirus équin-1.

stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr

Côme Thieulent^{1,2}, Gabrielle Sutton^{1,2}, Erika Hue^{1,2,3}, Christine Fortier^{1,2,3}, Marie-Pierre Toquet^{1,2}, Alexis Pléau⁴, Alain Deslis⁴, Edouard Guiton⁴, Romain Paillot⁵, et Stéphane Pronost^{1,2,3}

¹ LABÉO

² Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450

³ Normandie Univ, UNICAEN, ImpedanCELL

⁴ INRAE, UE-1277 Plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE), Centre de recherche Val de Loire

⁵ School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College

Partenaire(s)



Financier(s)



Ce projet est cofinancé par le Fonds européen de développement régional



Type de présentation : oral – Projet de recherche

Ce qu'il faut retenir

L'herpèsvirus équin 1 (HVE-1) est un pathogène majeur chez les équidés, responsable de 3 formes principales de maladie : la forme respiratoire, la forme abortive et la forme nerveuse. Ce travail présente des avancées significatives dans le traitement antiviral. Une infection expérimentale de poneys Welsh avec la souche HVE-1 FR-56628 (C2254) en présence ou non de Valganciclovir a été réalisée en 2020 sur la Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE) de l'INRAE de Nouzilly. Au cours de cette étude, menée par les équipes de LABÉO et la PFIE, l'ensemble des chevaux infectés a présenté des signes cliniques caractéristiques des infections respiratoires à HVE-1 à des degrés divers (fièvre > 38,5°C ; jetage nasal ; toux, inflammation des ganglions, sécrétions oculaires, changement de comportement). L'administration du valganciclovir par voie orale au cours de notre étude a permis de maintenir une concentration plasmatique à un seuil comparable à celui des concentrations utilisées *in vitro*. L'ensemble des effets observés en présence du valganciclovir est actuellement en cours de soumission pour publication dès leur validation par les pairs. Ils seront présentés de façon exhaustive dans un futur article à venir.

Objectif à atteindre:



Cliché: P. Fritz
Cheval infecté par l'HVE-1 atteint d'encéphalomyélite à herpesvirus (EMH)

Traitement au (val)ganciclovir



Cliché: Pixabay
Cheval ne présentant plus de symptômes

1 Contexte et objectifs

Les infections herpétiques chez le cheval sont remarquées tant par la variabilité de leurs manifestations cliniques que par la diversité des virus impliqués. À ce jour, neuf herpèsvirus (HVE) sont décrits chez les équidés : les HVE-1 à 5 infectent majoritairement les chevaux ; les HVE-6 à 8, les ânes et l'HVE-9, principalement les zèbres. L'HVE-1 est communément appelé virus abortif équin et l'HVE-4, virus de la rhinopneumonie équine. L'HVE-1 a été détecté sur tous les continents et est responsable de lourdes pertes économiques. C'est un virus à ADN double brin d'environ 150 kilobases. L'HVE-1, comme tous les herpèsvirus, présente la particularité d'être retrouvé à l'état latent chez l'hôte après infection. Ce virus est très contagieux comme l'a montré l'épisode de Valence en février 2021, et nécessite l'application de mesures sanitaires strictes après sa détection que ce soit dans un haras, un centre équestre et même pendant le transport (respe.net).

L'HVE-1 est transmis par inhalation ou, après un avortement, par contact direct avec des éléments infectés comme le fœtus ou les annexes fœtales; mais des transmissions par voie iatrogène (contamination suite à un acte médical) ont également été décrites.

La dissémination du virus emprunte ensuite des voies impliquant plusieurs types cellulaires. En l'absence d'anticorps neutralisants dans le mucus, les cellules épithéliales des muqueuses nasale et nasopharyngienne sont infectées. La dissémination de l'HVE-1 jusqu'au tractus génital chez la jument peut conduire à un avortement. L'HVE-1 est d'ailleurs aujourd'hui reconnu comme la première cause d'avortement d'origine virale dans l'espèce équine. La dissémination du virus au niveau des tissus nerveux peut conduire à la forme nerveuse de la maladie nommée encéphalopathie (EHM) dont les signes cliniques caractéristiques décrits sont l'ataxie temporaire, la parésie, l'incontinence urinaire, mais également une paralysie complète pouvant conduire à l'euthanasie de l'animal.

Contrairement à ce qui est observé avec la vaccination contre le virus de la grippe équine, pour laquelle la couverture estimée à 87% est très satisfaisante [1], la couverture vaccinale contre l'HVE-1 demeure encore insuffisante, avec une estimation inférieure à 30%. Face à ces limitations les praticiens se tournent vers des approches complémentaires avec l'utilisation de traitements antiviraux pour les formes graves. Bien que son efficacité ne soit pas clairement démontrée, l'aciclovir demeure la molécule la plus utilisée sur le terrain. Notre équipe a travaillé en laboratoire sur le criblage de 2891 nouvelles molécules issues de différentes chimiothèques pour tester leur efficacité contre ce virus [2,4]. Ces travaux nous ont conduit à sélectionner huit molécules parmi lesquelles le valganciclovir (VGCV) qui présentait une activité antivirale *in vitro* 10 fois supérieure à celle de l'aciclovir [3]. Au sein de l'ensemble de ces molécules, seul le valganciclovir avait fait l'objet d'études pharmacocinétiques préalables, ce qui laissait entrevoir les perspectives d'un essai terrain [5]. Ce travail démontre une efficacité du valganciclovir *in vivo* après administration orale chez des poneys infectés par l'HVE-1.

2 Méthode

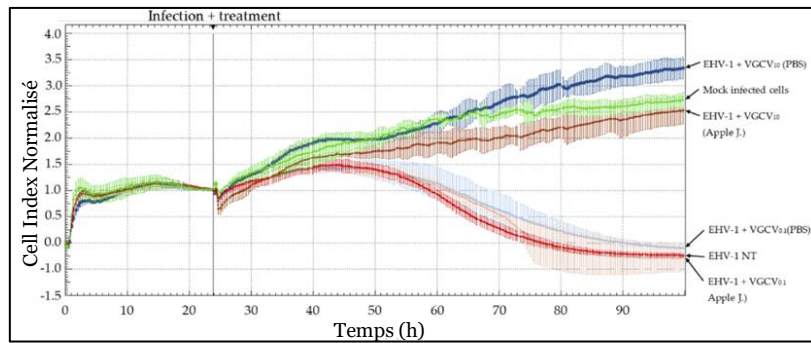
Cette étude expérimentale a été réalisée au sein de la Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE, UE 1277) de l'INRAE de Nouzilly selon la procédure 2010/63/EU après approbation du comité d'éthique (CEEA VdL, Comité N° 19 ; autorisation APAFiS -22708). Le VGCV a été préalablement dilué à une concentration de 100 mg/ml dans du jus de pomme. Des expériences *in vitro* ont été réalisées sur l'appareil RTCA xCELLigence® (ACEA Biosciences) pour démontrer que ce procédé n'affectait pas l'effet du VGCV. Lors de l'étude expérimentale, l'infection de 8 poneys Welsh mâles âgés de 10 mois a été réalisée par voie intranasale avec la souche FR-56628 (C₂₂₅₄) [6,7]. Quatre poneys contrôles ont reçu un placebo constitué d'un mélange de jus de pomme et de compote. Les quatre autres poneys ont été traités avec une dose de 6,5 mg/kg de VGCV, 3 fois le premier jour puis 2 fois par jour pendant 2 semaines. Le VGCV a été préalablement dilué à 100 mg/ml dans du jus de pomme, puis mélangé dans de la compote de pomme. Le traitement a été administré, en guise de récompense, après la manipulation des poneys lors de l'enregistrement des signes cliniques et de la réalisation des prélèvements. Ce traitement a été réalisé par voie orale en utilisant un pistolet drogueur. Les signes cliniques, l'excrétion virale et la virémie ont été mesurés pendant 3 semaines après infection. L'excrétion virale et la virémie ont été mesurées par culture cellulaire et par qPCR. Un suivi sérologique a permis d'objectiver la séroconversion. Le dosage du VGCV dans le sérum a été réalisé par HPLC-MS/MS 6495 (Agilent Technologies).

3 Résultats

3.1 Préparation du Valganciclovir

- La dilution du VGCV dans du jus de pomme à une concentration de 100 mg/ml n'affecte pas l'effet *in vitro* du VGCV contre l'EHV-1. Les effets antiviraux observés par impédancemétrie sont similaires entre le VGCV dilué dans du PBS ou du jus de pomme (Figure 1).

Figure 1 : Effet du jus de pomme sur l'action antivirale in vitro du Valganciclovir contre la souche HVE-1 KyD.

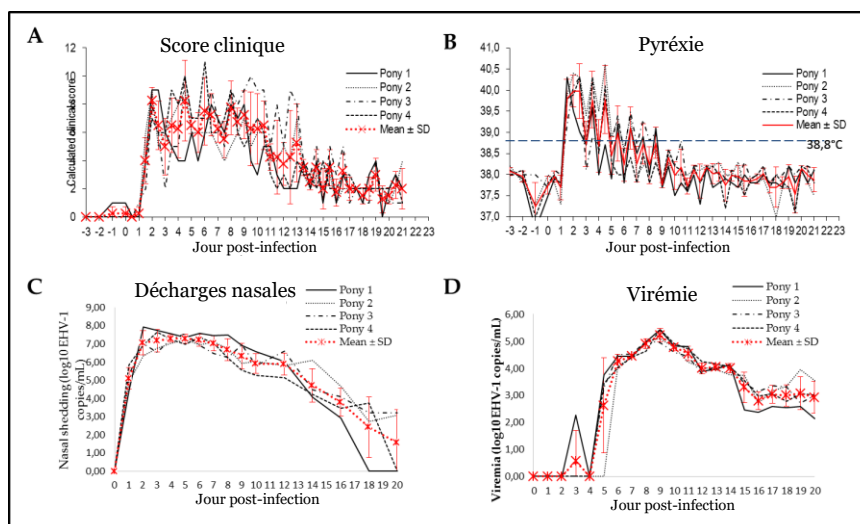


3.2 Infection expérimentale à l'HVE-1 : chevaux traités avec le placebo

- Tous les chevaux ont présenté une forte augmentation du score clinique dès le lendemain de l'infection, ce score ne diminuant qu'à partir du 10^{ème} ou 14^{ème} jour selon les chevaux. Seuls les résultats des chevaux traités avec le placebo sont présentés à ce stade (Figure 2A).
- Une température > 38,5°C a été observée chez tous les chevaux dès le lendemain de l'infection. Des températures élevées ont été enregistrées pendant 4 à 8 jours selon les chevaux (Figure 2B).
- Un gonflement des ganglions sub-mandibulaires a été enregistré chez un poney à 2 jours post-infection et chez tous les poneys du 3^{ème} au 11^{ème} jour post-infection.
- Tous les poneys ont présenté des signes de léthargie au deuxième jour post-infection ainsi qu'une perte d'appétit pendant la semaine suivant l'infection.
- De la toux a été enregistrée 2 jours post-infection chez tous les poneys puis de façon intermittente.
- Les prélèvements sur écouvillons étaient positifs en HVE-1 dès le premier jour post-infection et ce, jusqu'au 21^{ème} jour, malgré une diminution de la charge virale dès le 7^{ème} jour (Figure 2C).
- L'HVE-1 a été détecté dans tous les prélèvements sanguins : pour un poney, dès le 3^{ème} jour post-infection pour 2 poneys dès le 5^{ème} jour et pour le 4^{ème} poney dès le 6^{ème} jour post-infection. Tous étaient positifs jusqu'au 21^{ème} jour post-infection (Figure 2D). Le pic a été observé à 7 jours post-infection.

Aucun poney n'était positif à l'HVE-4 et au virus de la grippe équine durant toute la durée de l'étude.

Figure 2 : Suivi de quatre poneys Welsh infectés par la souche EHV-1 FR-56628 à partir du 3^{ème} jour précédant infection jusque 21 jours post-infection (population placebo de l'étude) (Sutton et al., 20206) : Scores cliniques (A), fièvre (B), excrétion nasale (C) et virémie (D).



Une séroconversion a été observée pour l'ensemble des poneys après 10 jours d'infection.

3.3 Infection expérimentale à l'HVE-1 : chevaux traités au valganciclovir

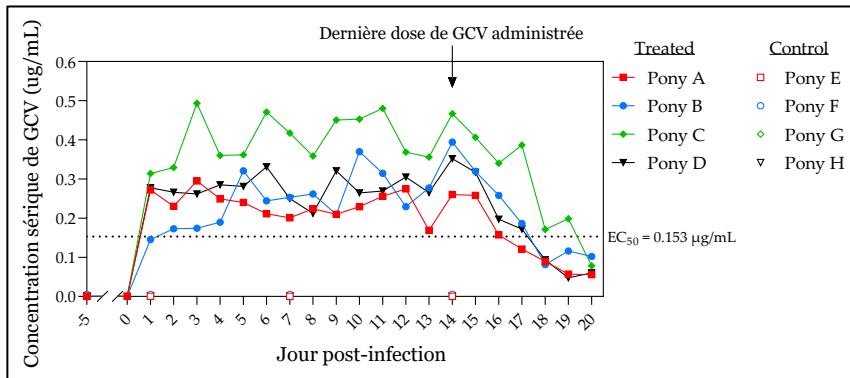
3.3.1 Signes cliniques des chevaux traités avec du valganciclovir

- L'ensemble des effets observés après traitement au VGCV font actuellement l'objet d'un reviewing pour validation par les pairs. Ils seront présentés de façon exhaustive dans un article à venir.

3.3.2 Pharmacocinétique du valganciclovir

- Le valganciclovir est la molécule administrée lors de l'étude et le ganciclovir est la forme active dosée dans le sérum. Le dosage du GCV sérique chez les 4 poneys traités a démontré la présence d'une concentration supérieure à 0.153 µg/ml pendant les 14 jours de traitement (valeur d'EC₅₀ déterminée lors d'expériences *in vitro*). Le GCV n'a pas été détecté dans le sérum des chevaux qui ont reçu le placebo (Figure 3).

Figure 3 : Suivi journalier de la concentration sérique en ganciclovir des poneys traités.



Les prélèvements sanguins étaient réalisés avant les administrations de valganciclovir (6,5 mg/kg). La concentration effectrice moyenne (EC₅₀) a été préalablement déterminée *in vitro* contre la souche HVE1 FR-56628 sur des cellules rénales embryonnaires équines. Aucune trace de ganciclovir n'a été détectée pour les poneys contrôles à D-5, D+1, D+7 et D+14.

4 Conclusions et applications pratiques

Une étude de pharmacocinétique du valganciclovir avait déjà été réalisée chez le cheval [5]. Ces résultats constituaient la première étape nécessaire avant la réalisation d'une étude *in vivo* de l'effet du valganciclovir sur l'infection à HVE-1. L'infection expérimentale avec la souche HVE-1 FR-56628 (C2254) a été réalisée en 2020 sur la plateforme de l'INRAE de Nouzilly par une collaboration des équipes de LABÉO et de la PFIE. Cette étude a démontré que l'ensemble des chevaux infectés a présenté des signes cliniques caractéristiques des infections respiratoires à HVE-1 à des degrés divers (fièvre > 38,5°C, jetage nasal, toux, gonflement des ganglions, sécrétions oculaires, changement de comportement). L'administration du valganciclovir par voie orale au cours de notre étude a permis de maintenir la concentration plasmatique du ganciclovir à un seuil comparable à celui des concentrations utilisées *in vitro* [3,5]. L'ensemble des effets observés en présence de valganciclovir sont encourageants mais sont actuellement en cours de soumission pour publication après validation par les pairs. Ils pourront être présentés de façon exhaustive dans un article à venir. Par ailleurs, des développements sur la base d'associations de molécules sont à l'étude afin d'optimiser le traitement. Les applications pratiques attendues sont des traitements antiviraux précoces possibles en complément de la vaccination qui demeure le moyen de prévention à privilégier face à cette maladie.

5 Pour en savoir plus

- [1] Fougere, S.; Fortier, C.; Legrand, L.; Jourdan, M.; Marcillaud-Pitel, C.; Pronost, S.; Paillot, R. Success and Limitation of Equine Influenza Vaccination: The First Incursion in a Decade of a Florida Clade 1 Equine Influenza Virus That Shakes Protection Despite High Vaccine Coverage. *Vaccines* 2019, 7 (4). <https://doi.org/10.3390/vaccines7040174>.
- [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] Thieulent, C.; Hue, E. S.; Sutton, G.; Fortier, C.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Paillot, R.; Vidalain, P.-O.; Pronost, S. Identification of Antiviral Compounds against Equid Herpesvirus-1 Using Real-Time Cell Assay Screening: Efficacy of Decitabine and Valganciclovir Alone or in Combination. *Antiviral Res.* 2020, 183, 104931. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104931>.
- [4] Thieulent, C.; Fortier, C.; Munier-Lehmann, H.; Suzanne, P.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Hans, A.; Paillot, R.; Vidalain, P.-O.; Pronost, S.; Hue, E. Screening of Potential Antiviral Molecules against Equid Herpesvirus-1 Using Cellular Impedance Measurement: Dataset of 2,891 Compounds. *Data Brief* 2020, 106492. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106492>.
- [5] 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>.
- [6] Sutton, G.; Thieulent, C.; Fortier, C.; Hue, E. S.; Marcillaud-Pitel, C.; Pléau, A.; Deslis, A.; Guitton, E.; Paillot, R.; Pronost, S. Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C2254/H752 Strain in French Horses Showing No Major Impact on the Strain Behaviour. *Viruses* 2020, 12 (10). <https://doi.org/10.3390/v12101160>.
- [7] Paillot, R.; Sutton, G.; Thieulent, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Pronost, S. New EHV-1 Variant Identified. *Vet. Rec.* 2020, 186 (17), 573. <https://doi.org/10.1136/vr.m1441>.