



HAL
open science

Criblage in vitro de molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin-1 par impédancemétrie et évaluation clinique de l'effet du valganciclovir

Côme Thieulent

► **To cite this version:**

Côme Thieulent. Criblage in vitro de molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin-1 par impédancemétrie et évaluation clinique de l'effet du valganciclovir. Médecine vétérinaire et santé animale. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC421 . tel-03118469

HAL Id: tel-03118469

<https://theses.hal.science/tel-03118469>

Submitted on 22 Jan 2021

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Criblage in vitro de molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin-1 par impédancemétrie et évaluation clinique de l'effet du valganciclovir

Présentée et soutenue par
Come THIEULENT

Thèse soutenue publiquement le 03/12/2020
devant le jury composé de

M. JEAN-LUC CADORE	Professeur des universités, Université Lyon 1 Claude Bernard	Rapporteur du jury
Mme AUDREY ESCLATINE	Professeur des universités, Université Paris-Saclay	Rapporteur du jury
Mme CAROLINE DENESVRE	Directeur de recherche, INRA Centre Val de Loire	Membre du jury
Mme AURE SAULNIER	Chercheur, SANOFI PASTEUR	Membre du jury
M. PIERRE-OLIVIER VIDALAIN	Directeur de recherche au CNRS, ENS Lyon Sciences	Membre du jury
M. STÉPHANE PRONOST	Docteur, Laboratoire LABÉO	Directeur de thèse

Thèse dirigée par STÉPHANE PRONOST, Biologie, Génétique et Thérapies Ostéo-Articulaires et Respiratoires



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Ces travaux de thèse ont été menés au sein du laboratoire BIOTARGEN (Biologie, génétique et thérapies ostéoarticulaires et respiratoires), plus précisément au sein de l'équipe MECIR (Mécanisme et Contrôle des Infections et Inflammation Respiratoire) et du pôle Recherche Développement et Innovation de LABÉO sur la plateforme de recherche équine Normandie Equine Vallée (site de Saint-Contest).



Mon contrat doctoral a été financé à 50% par la Région Normandie et à 50% par les Fonds Eperon.



Cette thèse a été réalisée grâce à l'indispensable soutien financier de LABÉO, de l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE), des Fonds Eperon, de la Région Normandie, du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Mon travail s'inscrit dans le cadre du projet CENTAURE co-financé par la Région Normandie, l'Union Européenne dans le cadre du programme opérationnel FEDER/FSE 2014-2020.



REMERCIEMENTS

Au terme des trois années de cette extraordinaire expérience humaine et scientifique, je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail de thèse.

Aux membres du jury. Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci au Pr. Audrey ESCLATINE et au Pr. Jean-Luc CADORÉ du temps et de l'intérêt qu'ils ont bien voulu consacrer à la lecture de ce manuscrit et d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Merci au Dr. Aure SAULNIER, au Dr. Caroline DENESVRE et au Dr. Pierre-Olivier VIDALAIN de l'honneur qu'ils me font d'être les examinateurs de ma soutenance.

A mon directeur de thèse. J'exprime mes plus profonds remerciements à mon directeur de thèse, Stéphane PRONOST. Merci pour ces années passées à tes côtés qui ont toujours été enrichissantes tant au niveau personnel que professionnel. C'est grâce à toi que j'ai acquis cette maturité scientifique. Merci également de t'être toujours rendu disponible, de m'avoir écouté et de m'avoir toujours permis de réaliser mes projets et suivre mes envies pour la réalisation de cette thèse. Enfin, merci pour ton humanité et ta gentillesse !

A toute l'équipe du pôle recherche de LABÉO. Un très grand merci à Guillaume FORTIER, Directeur Général de LABÉO et à Pierre-Hugues PITEL, Directeur du pôle Recherche pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Je te remercie Erika, pour ta disponibilité, ton aide lors des différentes expérimentations et pour l'ensemble des rédactions. Un grand merci à Romain, sans qui cette belle étude expérimentale n'aurait pas été possible. Merci pour tout ce que tu m'as appris tout au long de ces années passées au laboratoire. Tu as été un vrai moteur pour cette thèse. Merci à l'ensemble des doctorants de LABÉO. Gabrielle pour toute ton aide durant ces 3 années. Flora pour l'ensemble des gâteaux que tu nous as fait... Camille pour le nombre incalculable d'extractions réalisées et pour ton accent du nord qui te va si bien. Merci également à Clovis et Marine. Bon courage à tous pour vos thèses. Merci aux assistantes de recherche. Christine, pour ton aide et ton soutien depuis que je suis en stage à LABÉO. Sophie, pour l'ensemble des commandes et ton rire communicatif. Marie-Pierre, pour tes conseils lors la préparation pour le challenge et pour les manips réalisées dernièrement. Merci également à l'ensemble des membres du pôle Recherche et au service de Virologie et Biologie Moléculaire pour tous vos services rendus. Samuel pour le travail réalisé lors de l'expérimentation animal.

Aux membres de l'équipe BIOTARGEN. Merci Magali DEMOOR, directrice de l'équipe BIOTARGEN EA 7450, pour m'avoir accepté au sein de votre équipe de recherche et pour votre confiance. Bastien, mon partenaire de triathlon, de plongée, de chasse, de 3B et j'en

passé, j'espère te voir un peu plus à la piscine dans les prochains mois. Félicitations, tu es devenu un half-ironman bien avant moi ! Merci également à Clément et Aurélie. C'est vous les prochains (sauf toi Aurélie, il faudra attendre encore un peu). Merci également aux anciens doctorants, Marie, Romain et Stéphanie.

Aux membres du consortium SAVE. Je voudrais remercier plus particulièrement Pierre-Olivier VIDALAIN et Patrick DALLEMAGNE pour votre disponibilité, l'ensemble de vos conseils et remarques toujours bienveillants. Merci à Hélène, Stéphan, Aymeric, Peggy, Cécile, José-Carlos, Delphine et tous les autres. C'était un réel plaisir de travailler avec vous. Merci également pour vos encouragements.

Au professeur Hans NAUWYCK et son équipe. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire pendant ces deux semaines. Merci à Sarah et pour cette formation accélérée.

A toute l'équipe de la PFIE de l'INRAE de Nouzilly. Edouard, Stéphane, merci pour cette belle étude réalisée au sein de vos locaux. Alexis, Alain et tous les autres, merci pour votre aide et votre bonne humeur au quotidien.

A l'équipe ImpedanCELL. Merci à Christophe et à Emilie pour leur accompagnement tout au long de ma thèse avec la technologie RTCA xCELLigence®.

Au RESPE, pour toutes les données épidémiologiques transmises.

Aux membres de mon comité de suivi individuel (CSI). Merci à Véronique JULLIAND, Caroline DENESVRE, Thomas KNIGGE et Audrey THIEBAUT de m'avoir suivi tout au long de ces trois années de thèse.

A Nana. Ma plus belle des rencontres. Tu es apparue dans ma vie au moment où je m'y attendais le moins et ça fait maintenant 6 mois que tu es mon rayon de soleil au quotidien. Merci également pour toute ton aide lors de la rédaction de ce manuscrit, qui sans toi, ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui. J'espère pouvoir t'apporter autant que tu l'as fait pour moi lors de la rédaction de ton mémoire. J'ai hâte de passer ces 80 prochaines années en ta compagnie ! Merci aussi à toi **Blue**, pour le bonheur que tu nous apportes chaque jour. Vous êtes mes amours !

A mes chers parents, Marie-Claire et Joël, pour l'amour qu'ils me donnent, pour leurs paroles réconfortantes et leur soutien sans faille. Merci de m'avoir transmis les valeurs qui me guident maintenant dans ma vie professionnelle et personnelle. **A Honorine**, ma petite sœur pour ta gentillesse. J'ai hâte de te voir finir tes études et réaliser de grands projets. **A Geoffrey**, mon grand frère, pour l'amour que tu nous portes. J'espère pouvoir passer plus de temps à tes côtés dans les années qui suivent.

A mes amis et tous les autres. Pour finir, je souhaite remercier ceux et celles qui m'ont aidé et soutenu à un moment durant toutes ces années de thèse. Merci à Allan, Bastien, Cécile, Charles, Eden, Joachim, Johan, Juliette, Louise, Mickaël, Quentin, Romain et tous les autres pour vos encouragements et votre soutien.

TABLE DES MATIERES

Table des illustrations.....	1
Liste des abréviations	4
Chapitre 1 : Introduction	8
1. L'herpèsvirus équin 1	9
1.1. Histoire des herpèsvirus.....	9
1.2. L'ordre Herpesvirales	9
1.3. La famille Herpesviridae	10
1.4. Le genre Varicellovirus	12
1.5. Les herpèsvirus équins	12
1.6. L'herpèsvirus équin 1 : histoire.....	14
1.7. Structure de l'HVE-1	15
1.7.1. Génome.....	15
1.7.2. Capside	16
1.7.3. Tégument	16
1.7.4. Enveloppe	16
2. Cycle de réplication de l'HVE-1.....	17
2.1. Attachement du virus à la cellule	17
2.2. Entrée du virus dans la cellule	17
2.3. Transport de l'ADN viral jusqu'au noyau.....	18
2.4. Réplication du virus	18
2.5. Assemblage et relargage des virions	20
3. Pathogenèse et symptômes induits par l'HVE-1	22
3.1. Infection primaire du tractus respiratoire supérieur.....	22
3.2. Réplication secondaire dans les ganglions lymphatiques, mise en place de la virémie et latence.....	24
3.3. Réplication secondaire dans les organes cibles	24
3.3.1. Système reproducteur.....	26
3.3.2. Système nerveux central.....	28
3.3.3. Système oculaire.....	28
3.4. Latence et réactivation.....	30
3.5. Virulence des souches	31
4. Modèles d'étude de l'HVE-1	33
4.1. Culture de lignées cellulaire.....	33
4.2. Culture <i>ex vivo</i> d'explants de muqueuse respiratoire	34
4.3. Culture primaire de cellules épithéliales respiratoires équines.....	35
4.4. Modèle d'étude en flux dynamique	35
4.5. Modèles petits animaux.....	36

4.6. Modèle équin.....	37
5. Surveillance et moyens de lutte contre l’HVE-1	38
5.1. Mesures de prévention	38
5.1.1. Management.....	38
5.1.2. Vaccination.....	39
5.2. Mesures de prise en charge.....	41
5.3. Tests diagnostics en laboratoire	42
5.3.1. Diagnostic par culture cellulaire	43
5.3.2. Diagnostic par PCR.....	43
5.3.3. Tests immunologiques	45
6. Antiviraux anti-herpétiques	47
6.1. Molécules antivirales utilisées contre des herpèsvirus humains.....	47
6.1.1. Analogues de nucléosides	47
a) Analogues de guanosine : (val)aciclovir, (val)ganciclovir, penciclovir et famciclovir ..	50
b) Analogue d’adénosine : vidarabine, entecavir et lamivudine	53
c) Autre nucléoside : maribavir	55
6.1.2. Analogues de nucléotides	56
a) Adéfovir, cidofovir et ténofovir	56
b) Brincidofovir	58
6.1.3. Autres molécules anti-herpétiques	59
a) Foscarnet	59
b) Letermovir	60
c) Inhibiteur de l’entrée du virus	61
Docosanol.....	61
VZIG et VariZIG.....	61
6.2. Résistance aux thérapies actuelles	62
6.2.1. Emergences de souches d’HSV, de VZV et de CMV résistantes aux traitements par les antiviraux usuels	62
6.2.2 Mécanismes de résistance développés par les herpèsvirus face aux traitements antiviraux chez l’homme	63
6.3. De nouveaux candidats pour lutter contre les herpèsvirus	64
6.3.1. A-5021	64
6.3.2. FV-100	65
6.3.3. N-methanocarbothymidine.....	66
6.3.4. Les inhibiteurs d’hélicase-primase	67
6.4. Le repositionnement de molécules : une stratégie prometteuse pour la découverte de nouveaux traitements contre les herpèsvirus	72
7. Molécules antivirales utilisées contre l’HVE-1	73
7.1. Analogues de nucléosides	75
7.1.1. Analogues de guanosine	75
a) Aciclovir et valaciclovir.....	75
b) Ganciclovir et valganciclovir	76
c) Penciclovir et famciclovir	77
d) A-5021	77

7.1.2. Analogues d'adénosine	78
a) Vidarabine	78
7.1.3. Analogues d'uridine.....	78
a) Idoxuridine et brivudine	78
7.2. Analogues de nucléotides	78
7.3. Foscarnet.....	79
7.4. Autres composés testés contre l'HVE-1	79
7.4.1. siRNA	79
7.4.2. Extraits de plantes	80
7.4.3. Inhibiteurs d'histone déméthylase	80
7.4.4. Alpha-hydroxytropolones.....	80
8. Utilisation d'antiviraux contre d'autres herpèsviroses dans le domaine vétérinaire	81
8.1. FeHV-1.....	81
8.2. CaHV-1	81
8.3. BoHV-1	82
8.4. GaHV-2	82
8.5. EHV-1.....	82
8.6. HVE-9.....	83
Chapitre 2 : Objectifs des travaux de thèse	85
Chapitre 3 : Résultats	89
1. Développement et preuve de concept de l'utilisation de l'impédancemétrie pour le suivi <i>in vitro</i> de l'infection par les alphaherpèsvirus équins et l'évaluation de l'effet de molécules antivirales.....	90
1.1. Introduction	90
1.2. Article 1	94
1.3. Résultats et discussion	108
2. Identification de composés antiviraux contre l'herpèsvirus équin 1 à l'aide d'un criblage basé sur des tests cellulaires en temps réel : efficacité de la décitabine et du valganciclovir seuls ou en combinaison.....	110
2.1. Introduction	111
2.2. Article 2	112
2.3. Article 3	126
2.4. Résultats et discussion	135
3. L'administration orale de valganciclovir réduit les signes cliniques, l'excrétion virale et la virémie chez des poneys infectés expérimentalement par la nouvelle souche C ₂₂₅₄ d'herpèsvirus équin 1.....	137
3.1. Introduction	137
3.2. Article 4	140
3.3. Article 5	141

3.4. Résultats et discussion	160
Chapitre 4 : Discussion générale et perspectives.....	163
Chapitre 5 : Références	171
Chapitre 6 : Annexes	205
Annexe 1 : Publications scientifiques	206
Annexe 2 : Congrès internationaux	207
Annexe 3 : Congrès nationaux	209
Annexe 4 : Article : Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C ₂₂₅₄ /H ₇₅₂ Strain in French Horses showing no major impact on the strain behaviour (en révision)	211
Annexe 5 : Posters présentés durant ma thèse	238
Annexe 6 : Réalisations en parallèles des travaux de recherche	246

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

<i>Figure 1 : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique de l'ordre Herpesvirales</i>	<i>11</i>
<i>Figure 2 : Représentation schématique de la distribution des herpesvirus équins (HVE) après alignement des séquences du gène de l'ADN polymérase viral</i>	<i>14</i>
<i>Figure 3 : Structure de l'herpèsvirus équin 1</i>	<i>15</i>
<i>Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation génomique de l'HVE-1</i>	<i>16</i>
<i>Figure 5 : Représentation schématique du cycle de réplication de l'herpèsvirus équin 1.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 6 : Infection du tractus respiratoire supérieur par l'HVE-1 et diffusion du virus dans l'organisme</i>	<i>23</i>
<i>Figure 7 : Représentation schématique de la dissémination de l'HVE-1 chez le cheval.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 8 : Transmission de l'HVE-1 de la jument au fœtus</i>	<i>27</i>
<i>Figure 9 : Principaux signes cliniques associés à une infection par l'HVE-1 chez le cheval.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure 10 : Représentation schématique de l'ensemble des modèles d'étude utilisés pour étudier l'HVE-1.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 11 : Liste des vaccins disponibles en Europe contre l'HVE-1</i>	<i>40</i>
<i>Figure 12 : Observation au microscope de lignées cellulaires infectées ou non par l'HVE-1.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 13 : Principes de détection du signal PCR en temps réel</i>	<i>45</i>
<i>Figure 14 : Analogues d'uridine utilisés contre des herpesvirus humains.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 15 : Analogues de guanosine utilisés contre des herpesvirus humains</i>	<i>50</i>
<i>Figure 16 : Mode d'action de l'aciclovir (modèle d'analogue de guanosine) pour inhiber la synthèse d'ADN viral.....</i>	<i>52</i>

<i>Figure 17 : Métabolisation et devenir du ganciclovir (GCV) après absorption orale de valganciclovir (VGCV)</i>	<i>53</i>
<i>Figure 18 : Analogues de nucléosides utilisés comme molécules antivirales en médecine humaine</i>	<i>54</i>
<i>Figure 19 : Structure du maribavir.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 20 : Analogues de nucléotides utilisés comme antiviraux.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 21 : Structure chimique du foscarnet</i>	<i>59</i>
<i>Figure 22 : Structure du letermovir.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 23 : Structure du docosanol.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 24 : Structure de la molécule A-5021</i>	<i>65</i>
<i>Figure 25 : Structure du composé Cf1743 et de sa pro-drogue, le FV-100.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 26 : Structure du N-methanocarbathymidine.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 27 : Mécanismes d'inhibition de la synthèse des virus à ADN par les analogues de nucléosides et les inhibiteurs du complexe hélicase/primase</i>	<i>68</i>
<i>Figure 28 : Inhibiteurs du complexe hélicase/primase.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 29 : Représentation schématique de l'activation et du mode d'action des molécules anti-herpétiques présentées dans ce manuscrit</i>	<i>71</i>
<i>Figure 30 : Plaque de culture 96 puits avec des microélectrodes en or fixées au fond utilisée avec l'appareil RTCA xCELLigence®, appelée E-plate®</i>	<i>91</i>
<i>Figure 31 : Représentation schématique des puits des E-plate® permettant la mesure de la variation d'impédance cellulaire.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 32 : Représentation graphique de l'évolution du Cell Index au cours du temps</i>	<i>93</i>

Tableaux

Tableau 1 : Différentes espèces appartenant au genre *Varicellovirus*.....13

Tableau 2 : Valeurs des concentrations efficaces médianes (EC_{50}) des molécules antivirales testées *in vitro* contre l'HVE-1 lors de différentes études.....74

ABREVIATIONS

A

α HT :	Alpha-hydroxytropolones
A ₂₂₅₄ :	Adénine en position 2254 de l'ADN polymérase de l'HVE-1
ACV :	Aciclovir
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES :	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Ara-H :	Arabinofuranosyl-Hypoxanthine
ARN :	Acide RiboNucléique
ASP-2151 :	Amenamevir
ATP :	Adénosine TriPhosphate
AUC :	Aire sous la courbe

B

BAY 57-1293 :	Pritelivir
BoHV-1 :	Bovine alphaherpesvirus type 1
BoHV-5 :	Bovine alphaherpesvirus type 5
BVDU :	Brivudine

C

C ₂₂₅₄ :	Cytosine en position 2254 de l'ADN polymérase de l'HVE-1
CaHV-1 :	Canid alphaherpesvirus 1
CDC :	Centers for Control Disease and Prevention
CDV :	Cidofovir
CERMN :	Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie
CHO-K1 :	Cellules ovariennes d'hamster de Chine
CI :	Cell Index
CIT ₅₀ :	Temps requis pour réduire le Cell Index de 50%
CMH I :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 1
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CMV :	Cytomegalovirus
COVID-19 :	Coronavirose due au virus SARS-CoV-2
CSI :	Comité de Suivi Individuel

D

D ₇₅₂ :	Acide aspartique en position 752 de l'ADN
DP :	DiPhosphate
DTB :	Decitabine
dTTP :	désoxyThymidine TriPhosphate

E

E :	Early genes : gènes précoces
ED :	Cellules équines dermiques (E. Derm)
EBV :	Virus d'Epstein Barr
EC ₅₀ :	Concentration efficace médiane
ECP :	Effets CytoPathiques
EEK :	Cellules rénales d'embryon équin
EEL :	Cellules pulmonaires d'embryon équin
EFL :	Cellules pulmonaires de fœtus équin
EHV-9 :	Equid alphaherpesvirus 9
EIHV-1 :	Elephantid betaherpesvirus 1
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA :	Agence de Médecine Européenne
ERECs :	Cellules primaires épithéliales respiratoires équines
ETIF :	α -trans-inducting factor

F

FCV :	Famciclovir
FDA :	Food Drug Association
FEDER :	Fonds Européen de Développement Economique et Régional
FeHV- 1 :	Felid alphaherpesvirus 1
FHK :	Cellules rénales de fœtus équin

G

g :	glycoprotéine
G ₂₂₅₄ :	Guanine en position 2254 de l'ADN polymérase de l'HVE-1
GaHV-2 :	Gallid alphaherpesvirus 1
GCV :	Ganciclovir
GTB :	Gemcitabine

H

H ₇₅₂ :	Histidine en position 752 de l'ADN polymérase de l'HVE-1
H/P :	Hélicase/Primase
HDP-CDV :	Brincidofovir
HHV-6 :	Herpèsvirus Humain de type 6
HSV-1 :	Herpès Simplex Virus de type 1
HSV-2 :	Herpès Simplex Virus de type 2
HVE :	HerpèsVirus Equin

I

IC ₅₀ :	Concentration Inhibitrice médiane
ICTV :	International Committee on Taxonomy of Viruses
IDU :	Idoxuridine
IE :	Immédiate-early genes : gènes très précoces
IFCE :	Institut Français du Cheval et de l'équitation

IgG : Immunoglobuline G
INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

K

kb : kilobase
K_c : Kinase cellulaire
K_v : Kinase virale
KyD : Souche d'HVE-1 Kentucky D

L

L : Late genes : gènes tardifs
LATs : Transcrits associés à la latence
Log₁₀ : Logarithme décimal
LSD1 : Déméthylase 1 lysine-spécifique

M

MDBK : Cellules rénales bovine Madin-Darby
MHE : Myéloencéphalopathie Herpétique Equine
MP : MonoPhosphate

N

N₇₅₂ : Acide asparagine en position 752 de l'ADN polymérase
N-MCT : North-methanocarbothymidine
NTPase : Nucléoside Triphosphate Phosphohydrolase

O

OAT1 : Transporteur d'anions organiques humains 1
ORF : Cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame)

P

PBMCs : Cellules mononucléaires du sang périphérique
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCV : Penciclovir
PFIE : PlateForme d'Infectiologie Expérimentale
PFKC : Cellules primaires de poumons foetaux équins
PK15 : Cellules épithéliales de rein de porc
PMEA : Adéfovir
PMPA : Ténofovir
PRK : Cellules rénales primaires de lapin

Q

qPCR : quantitative PCR

R

RESPE :	Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Equine
RFC :	Réaction de Fixation du Ccomplément
RK13 :	Cellules épithéliales rénales de lapin
ROCK 1 :	Protéine kinase associée à Roh
RTCA :	Real Time Cell Analysis

S

SAVE :	Stratégie AntiVirales Equines
SARS-Cov 2 :	Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2
siRNA :	Petits ARN interférents
SN :	Séro-neutralisation
SNC :	Système Nerveux Central
SNP :	Polymorphisme d'un seul nucléotide
SuHV-1 :	Suid alphaherpesvirus 1

T

TK :	Thymidine Kinase
TP :	TriPhosphate
TRF :	Trifluridine
TR _L /IR _L :	Séquence inversée-répétée longue
TR _S /IR _S :	Séquence inversée-répétée courte

U

U _L :	Séquence unique longue
U _S :	Séquence unique courte

V

VACV :	Valaciclovir
VariZIG :	Varicella-Zoster ImmunoGlobulines
VGCV :	Valganciclovir
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIR :	Vidarabine
VZIG :	Varicella-Zoster Immune Globuline
VZV :	Virus varicelle-zona

Chapitre 1 :

INTRODUCTION

1. L'herpèsvirus équin 1

1.1. Histoire des herpèsvirus

Les premiers écrits relatant l'existence d'infections causées par un herpèsvirus datent de la Grèce antique. En effet, le mot "herpes" provient de la racine grecque " ἔρπω, hérépô" et fut utilisé par Hippocrate pour décrire des lésions qui semblent "ramper" à la surface de la peau des personnes infectées. Peu de temps après, c'est Hérodote qui rattacha ce terme aux ulcères et vésicules labiales associés à de la fièvre.

Aux XV^{ème} et XVI^{ème} siècles, Shakespeare y fit référence dans ses écrits : "O'er ladies lips, who straight on kisses dream, which oft the angry Mab with blisters plagues, because their breaths with sweetmeats tainted are" (Shakespeare, 1594, Romeo and Juliet, acte 1 scène 4) évoquant la présence de l'herpès labial comme un "fléau" et les personnes infectées comme "contaminées". Mais ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que le scientifique français Emile Vidal démontra la transmission de ce virus entre individus (Wildy, 1973).

La découverte du virus de la mosaïque du tabac à la fin du XIX^{ème} siècle a permis l'émergence d'une science nouvelle, la virologie. Depuis, l'étude des virus est en plein essor, notamment grâce au développement de nouvelles technologies. De nombreux progrès ont ensuite été faits au cours du XX^{ème} siècle sur la découverte et la connaissance des herpèsvirus. La virologie a pris un nouvel essor cette année (2020) au niveau mondial suite à la pandémie de COVID-19 liée au coronavirus SARS-CoV-2. En effet, celle-ci a obligé la communauté scientifique à développer des tests toujours plus rapides et fiables, des vaccins et des traitements antiviraux de dernière génération.

1.2. L'ordre Herpesvirales

Le genre *herpesvirus* est apparu en 1971 dans le premier rapport du comité international de taxonomie des virus (International Committee on Taxonomy of Viruses ; ICTV ; <https://talk.ictvonline.org>). Dans son second rapport, l'ICTV éleva ce genre au rang de famille en 1976 et la nomma *Herpetoviridae* puis *Herpesviridae* en 1979 (Matthews, 1979). Ce n'est qu'en 2009 que l'ICTV créa l'ordre *Herpesvirales* (Davison et al., 2009). Les virus

appartenant à cet ordre possèdent tous des caractéristiques structurales similaires : un génome linéaire à ADN double-brin, de poids moléculaire élevé, contenu dans une capsidie icosaédrique, elle-même entourée d'une matrice protéique appelée tégment et d'une enveloppe lipidique. Les herpèsvirus possèdent aussi des propriétés biologiques communes, notamment l'expression de différentes enzymes importantes pour : le métabolisme de l'ADN/ARN (thymidine kinase), la synthèse de l'ADN (ADN hélicase) et la régulation des protéines (protéine kinase). La réplication et l'assemblage des herpèsvirus se produisent tous deux dans le noyau. Tous les herpèsvirus connus actuellement peuvent établir et maintenir une période de latence dans la cellule hôte. Ces virus sont associés à de nombreuses infections chez différentes espèces telles que les oiseaux, les poissons, les reptiles et les mammifères. L'ordre *Herpesvirales* est divisé en trois familles. La famille *Herpesviridae* est la plus grande, avec plus de cent espèces de virus décrites pouvant infecter les mammifères, les oiseaux et les reptiles. La famille *Alloherpesviridae* regroupe les herpèsvirus infectant les poissons et les grenouilles. La famille *Malacoherpesviridae*, la plus récente des trois, regroupe les deux seuls herpèsvirus connus pour infecter les mollusques (Davison et al., 2009) (Figure 1 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

1.3. La famille *Herpesviridae*

La famille *Herpesviridae* est subdivisée en trois sous-familles selon des critères morphologiques et biologiques : *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae* (Figure 1).

Les alphaherpèsvirus sont capables d'infecter une large gamme d'hôtes. *In vitro*, ils sont capables d'infecter des cellules de différentes espèces animales et s'y propagent rapidement. *In vivo*, ils possèdent un cycle de réplication relativement court et efficace et établissent leur latence principalement dans les cellules neuronales sensorielles et les lymphocytes (Riaz et al., 2017). Bien qu'ils soient susceptibles d'infecter de nombreuses espèces lors d'études expérimentales, chacun de ces virus est adapté à un hôte spécifique (Rajcani and Durmanova, 2001). Les virus appartenant à cette sous-famille sont divisés en cinq genres (Figure 1) : *Iltovirus*, *Mardivirus*, *Scutavirus*, *Simplexvirus* et *Varicellovirus* (Davison et al., 2009).

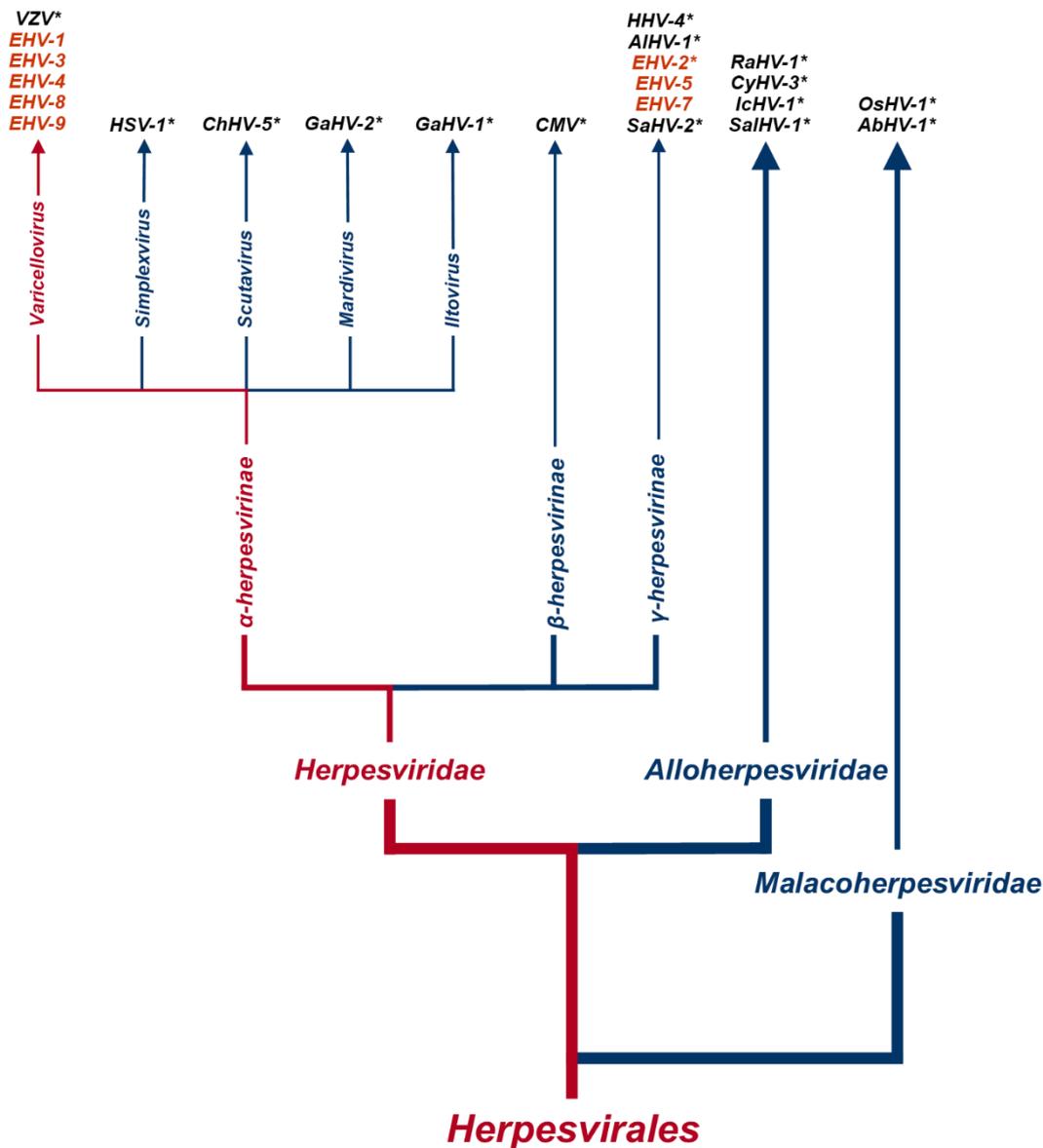


Figure 1 : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique de l'ordre Herpesvirales. Une étoile (*) indique l'espèce type de chaque genre et les espèces en rouge représentent les herpesvirus équin. Schéma adapté d'après Davison (2002) et Davison et al., 2009.

Les betaherpèsvirus se différencient des alphaherpèsvirus principalement par leur nombre limité d'hôtes et leur cycle de réplication plus lent (Riaz et al., 2017). *In vitro*, ils ne peuvent se multiplier que dans des cellules provenant de leur hôte spécifique. *In vivo*, la latence de ces virus se fait principalement dans les monocytes et les macrophages (Riaz et al., 2017). Les betaherpèsvirus sont divisés en quatre genres : *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Proboscivirus* et *Roseolovirus* (Davison et al., 2009).

Les gammaherpèsvirus possèdent un nombre d'hôtes encore plus limité. *In vitro*, ils se reproduisent dans un nombre limité de modèles cellulaires. *In vivo*, leur latence est connue pour se faire majoritairement dans les lymphocytes B et T (Ackermann, 2006). Cette sous-famille est subdivisée en 4 genres : *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Percavirus* et *Rhadinovirus* (Davison et al., 2009).

1.4. Le genre *Varicellovirus*

Le genre *Varicellovirus* regroupe dix-sept espèces de virus capables d'infecter des mammifères. L'ensemble de ces virus est répertorié dans le Tableau 1 : Différentes espèces appartenant au genre *Varicellovirus* (<https://talk.ictvonline.org>). C'est au sein de ce genre que l'on trouve l'*Equid alphaherpesvirus 1* (EHV-1), également appelé herpèsvirus équin 1 (HVE-1). L'*Human alphaherpesvirus 3*, aussi appelé virus varicelle-zona (VZV) correspond à l'espèce type du genre *Varicellovirus*.

1.5. Les herpèsvirus équins

Actuellement huit herpèsvirus sont reconnus comme infectieux chez les équidés (Figure 2). Parmi eux, les HVE-1, HVE-3, HVE-4, HVE-8 et HVE-9 appartiennent à la sous-famille *Alphaherpesvirinae* et au genre *Varicellovirus* (Tableau 1). Tandis que les HVE-2, HVE-5 et HVE-7 appartiennent à la sous-famille *Gammaherpesvirinae*. Les HVE-2 et HVE-5 font partie du genre *Percavirus* tandis que l'HVE-7 n'appartient à aucun genre (Davison et al., 2009). Il n'y a pas de betaherpèsvirus connu à ce jour chez les équidés. Les HVE-1 à HVE-5 induisent des formes cliniques principalement chez les chevaux. L'HVE-8, anciennement appelé herpèsvirus asin 3, est connu pour provoquer des symptômes principalement chez les ânes (Browning et al., 1988; Liu et al., 2012) mais a été récemment détecté chez des chevaux (Garvey et al., 2018). L'HVE-9 est connu pour infecter les zèbres mais a aussi été retrouvé chez de nombreuses espèces de mammifères, telles que la gazelle de Thomson, l'ours polaire et la girafe (Donovan et al., 2009; Fukushi et al., 1997; Greenwood et al., 2012; Kasem et al., 2008; Schrenzel et al., 2008). Les chevaux ne sont pas les hôtes naturels de l'HVE-9 mais ce virus s'est montré capable d'infecter cette espèce lors d'une étude expérimentale (Taniguchi et al.,

2000). Par ailleurs, avec respectivement 93% et 95% d'homologie de séquence au niveau du gène de l'ADN polymérase, l'HVE-8 et l'HVE-9 possèdent une forte homologie avec l'HVE-1

(Figure 2).

Tableau 1 : Différentes espèces appartenant au genre *Varicellovirus* (<https://talk.ictvonline.org>).

Nomenclature internationale	Abbréviation	Espèce hôte
<i>Bovine alphaherpesvirus 1 & 5</i>	BoHV-1, -5	
<i>Bubaline alphaherpesvirus 1</i>	BuHV-1	
<i>Canid alphaherpesvirus 1</i>	CaHV-1	
<i>Caprine alphaherpesvirus 1</i>	CpHV-1	
<i>Cercopithecine alphaherpesvirus 9</i>	CeHV-9	
<i>Cervid alphaherpesvirus 1 & 2</i>	CvHV-1, -2	
<i>Equid alphaherpesvirus 1, 3, 4</i>	EHV-1, -3, -4	
<i>Equid alphaherpesvirus 8</i>	EHV-8	
<i>Equid alphaherpesvirus 9</i>	EHV-9	
<i>Felid alphaherpesvirus 1</i>	FeHV-1	
<i>Human alphaherpesvirus 3 (Varicella zoster virus)</i>	HHV-3 (VZV)	
<i>Monodontid alphaherpesvirus 1</i>	MoHV-1	
<i>Phocid alphaherpesvirus 1</i>	PhHV-1	
<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	SuHV-1	

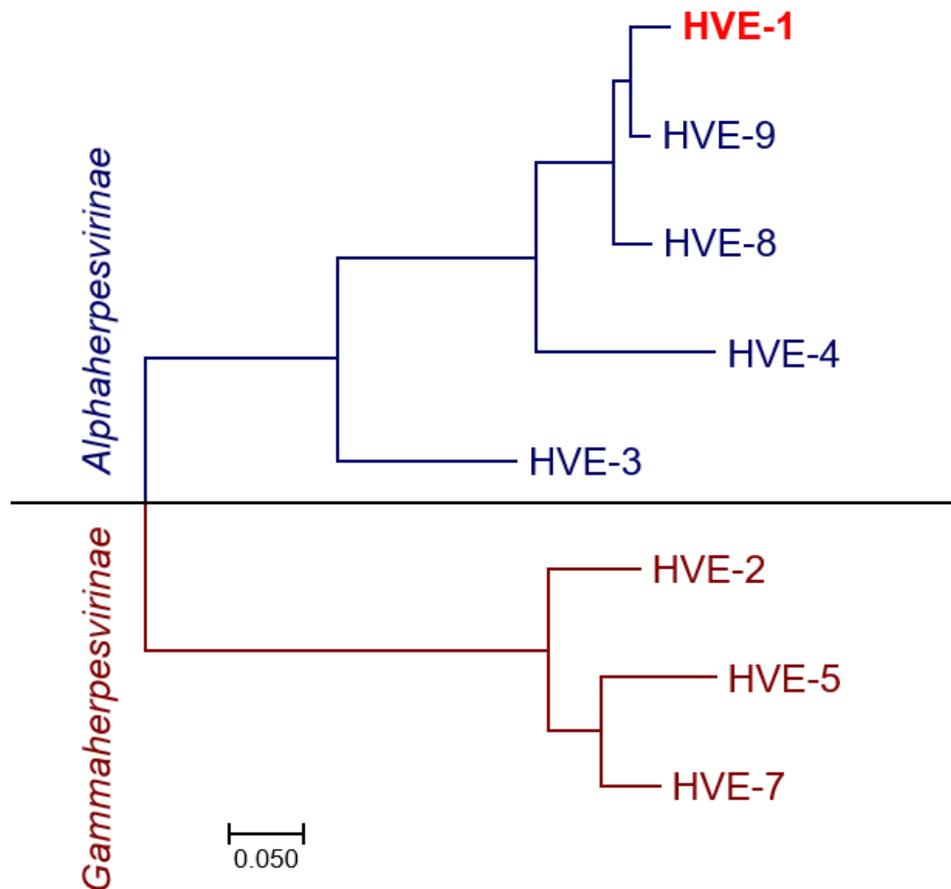


Figure 2 : Représentation schématique de la distribution des herpèsvirus équins (HVE) après alignement des séquences du gène de l'ADN polymérase viral.

Parmi les herpèsvirus équins, l'HVE-1 représente la forme ancestrale (Karlin et al., 1994) et possède de fortes similarités avec la majorité des herpèsvirus humains, dont l'herpès simplex virus de type 1 (HSV-1) et le VZV. En termes de classification l'HVE-1 est également très proche d'herpèsvirus fortement pathogènes d'autres mammifères tels que le *Bovine alphaherpesvirus* (BoHV)-1, le BoHV-5 et le *Suid alphaherpesvirus-1* (SuHV-1) (Davison et al., 2009).

1.6. L'herpèsvirus équin 1 : historique

L'HVE-1 est l'un des virus les plus pathogènes chez les chevaux. Il peut induire différentes formes cliniques tels que des atteintes respiratoires, des troubles nerveux et des avortements. Les premiers cas d'avortements chez les juments causés par un microorganisme non bactérien ont été décrits en 1932 par Dimock et Edwards dans le Kentucky (Dimock and

Edwards, 1932). L'utilisation de matériel biologique provenant de ces foetus avortés a permis de reproduire d'autres cas d'avortements lors d'infections expérimentales (Dimock and Edwards, 1933). L'agent responsable a d'abord été désigné sous le nom de « equine abortion virus » (Dimock, 1940) avant d'être renommé equine herpesvirus type-1 (EHV-1). Les premiers cas de troubles nerveux chez des juments infectées ont été décrits en 1949 par Manninger (1949). Mais ce n'est qu'en 1966 que les premières souches d'HVE-1 ont été isolées à partir du système nerveux central de chevaux ataxiques (Saxegaard, 1966). L'utilisation de la microscopie électronique a permis de classer ce virus parmi les herpesvirus (Plummer and Waterson, 1963). Etant très proches au niveau de leurs séquences génétiques, les HVE-1 et HVE-4 furent considérés comme deux sous-types du même virus jusqu'en 1981. Les nomenclatures HVE-1 et HVE-4 furent officiellement acceptées par l'ICTV en 1988 (Roizmann et al., 1992).

1.7. Structure de l'HVE-1

Comme la plupart des herpesvirus, les particules d'HVE-1 ont une taille d'environ 200 à 250 nm et sont constituées de quatre principaux éléments : le génome, la capside, le tégument et l'enveloppe (Figure 3).

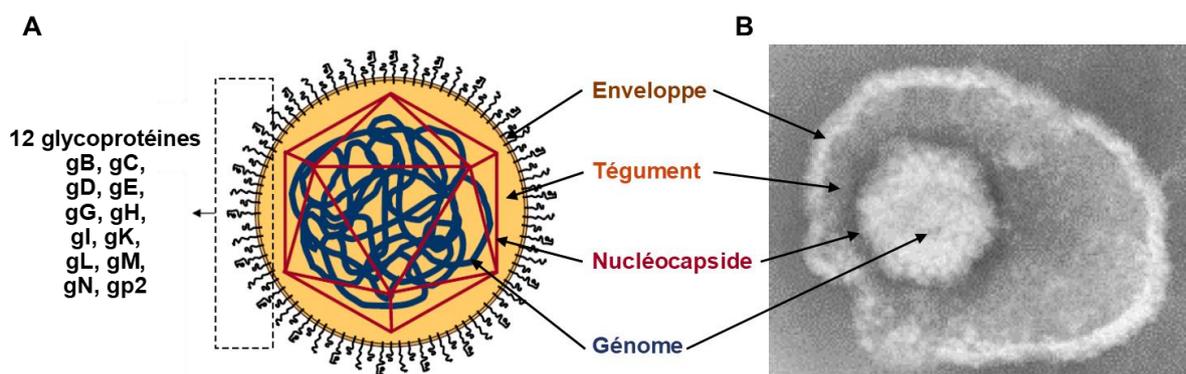


Figure 3 : Structure de l'herpèsvirus équin 1 (HVE-1). (A) Représentation schématique. (B) Particule virale observée par microscopie électronique (Animal Health Trust). Schéma adapté d'après Paillot et al., 2008.

1.7.1. Génome

Le génome de l'HVE-1 a été séquencé pour la première fois par Telford et al. (1992). Il est constitué d'un ADN double brin linéaire de 150,2 kb. Le génome est composé d'une

longue séquence unique (U_L) et d'une courte séquence unique (U_S). Ces régions sont flanquées par une longue séquence inversée-répétée (TR_L/IR_L) et une courte séquence inversée-répétée (TR_S/IR_S) (Figure 4). Le génome de l'HVE-1 contient 80 cadres ouverts de lecture (ORFs) codant 76 protéines virales.



Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation génomique de l'herpèsvirus équin 1 (HVE-1). TR, terminal repeat; IR, internal repeat; U, unique; L, long; S, short.

1.7.2. Capside

Le génome de l'HVE-1 est enfermé dans une capsidie icosaédrique appelée nucléocapsidie constituée de 6 protéines codées par les ORFs 22, 25, 35, 42, 43 et 56 (Perdue et al., 1974). La capsidie est formée de 162 capsomères (12 pentons et 150 hexons) protégeant le génome viral (Figure 3).

1.7.3. Tégument

Le tégument correspond à la couche protéique entourant la nucléocapsidie (Figure 3). Au moins douze protéines et enzymes virales, codées par les ORFs 11, 12, 13, 14, 19, 23, 24, 40, 46, 48, 49, 51 et 76, constituent le tégument et sont impliquées dans la réplication virale (Paillot et al., 2008; Telford et al., 1992b).

1.7.4. Enveloppe

L'enveloppe virale, entourant le tégument et la nucléocapsidie, forme la couche externe du virus (Figure 3). L'enveloppe de l'HVE-1 est constituée d'une bicouche de phospholipides, dérivée du réseau trans-Golgi de la cellule hôte et dans laquelle sont incorporées douze glycoprotéines. Onze d'entre elles sont des homologues de glycoprotéines retrouvés chez d'autres alphaherpèsvirus et sont nommées avec la nomenclature de l'HSV-1 (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM and gN). L'HVE-1 code également une douzième glycoprotéine, nommée gp2, également retrouvée chez les HVE-3 et HVE-4. Les glycoprotéines de l'enveloppe sont impliquées dans la fixation, l'entrée, la fusion, la pénétration et la sortie des particules virales de la cellule. Ces différentes étapes sont présentées dans la partie 2.

2. Cycle de réplication de l'HVE-1

2.1. Attachement du virus à la cellule

L'attachement des particules d'HVE-1 à leurs cellules cibles débute par l'interaction entre les glycoprotéines gC et gB (chargées positivement) avec les sulfates d'héparanes (chargés négativement) présents à la surface des cellules (Laval et al., 2016; Neubauer et al., 1997; Osterrieder, 1999). Cette interaction non spécifique et réversible permet de concentrer les particules virales à la surface cellulaire. Après cette première étape d'attachement, la glycoprotéine gD se lie à un ou plusieurs récepteurs cellulaires pour stabiliser le complexe et permettre au virus de pénétrer dans la cellule (Csellner et al., 2000) (Figure 5-1). Les récepteurs cellulaires de la gD restent encore mal connus. Frampton et al. (2005) ont montré que la gD de l'HVE-1 utilise le complexe majeur d'histocompatibilité équin de classe 1 (CMH I) comme récepteur pour entrer dans les cellules équines. D'autres études plus récentes ont montré que la liaison au CMH I contribue à l'entrée du virus dans les cellules endothéliales vasculaires du cerveau équin et dans les cellules équines dermiques (ED ; E. Derm) (Kurtz et al., 2010; Sasaki et al., 2011). En revanche, l'attachement du virus aux cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) est facilité par la liaison de la gD à d'autres récepteurs cellulaires, dont les intégrines, et non au CMH I (Azab et al., 2012; Laval et al., 2016). Des études supplémentaires sont nécessaires pour caractériser l'ensemble des récepteurs cellulaires impliqués dans l'étape d'attachement de l'HVE-1.

2.2. Entrée du virus dans la cellule

Une fois la glycoprotéine gD liée à son récepteur cellulaire, elle change de conformation, ce qui permet l'activation du complexe gH-gL et l'activation de la gB. Cette interaction induit l'entrée du virus dans la cellule (Spear and Longnecker, 2003). En fonction du type cellulaire, la pénétration du virus se fait par fusion directe avec la membrane cellulaire (Figure 5-2a) ou par endocytose (Figure 5-2b). Bien que ces voies d'entrées soient distinctes, elles nécessitent toutes les deux l'activation de la protéine kinase 1 associée à Roh (ROCK 1) (Frampton et al., 2007). Différentes études ont montré que l'HVE-1 entre par fusion directe dans les cellules épithéliales rénales de lapin (RK13) et les cellules ED (Azab et al.,

2013; Frampton et al., 2007). Cependant, Hasebe et al. (2009) ont démontré que ce virus s'introduit également par endocytose dans les cellules ED et dans les cellules endothéliales microvasculaires de cerveau équin. Van de Walle et al. (2008) ont rapporté que l'HVE-1 entre dans les cellules ovariennes d'hamster de Chine (CHO-K1) et dans les PBMCs par endocytose en utilisant des intégrines mais qu'il entre par fusion dans les cellules endothéliales équines. Plus récemment, Laval et al. (2016) suggèrent que l'HVE-1 s'introduit dans les PBMCs par phagocytose. L'HVE-1 a donc développé plusieurs mécanismes d'entrée, lui permettant ainsi d'accéder à un large spectre cellulaire. Ces deux mécanismes d'entrée permettent à la capsid virale d'être relarguée dans le cytoplasme (Figure 5-3). Il semble que les mécanismes d'entrée de l'HVE-4, pourtant très proche génétiquement de l'HVE-1, soient plus restreints ce qui pourrait être à l'origine des différences dans l'expression de la pathologie (Ma et al., 2013).

2.3. Transport de l'ADN viral jusqu'au noyau

Une fois relarguée dans le cytoplasme, la capsid est ensuite transportée le long de microtubules jusqu'au noyau à l'aide de complexes de dynéines (Frampton et al., 2010) (Figure 5-4). Seul l'ADN viral entre dans le noyau *via* des complexes nucléoporeux (Figure 5-5). La nucléocapsid, quant à elle, semble se désassembler et disparaître dans le cytoplasme (Pasdeloup et al., 2009; Sodeik et al., 1997).

2.4. Réplication du virus

Une fois libéré dans le noyau, l'ADN viral se circularise et peut soit rester latent, soit entrer en cycle lytique (Garber D. A. et al., 1993; Su et al., 2002). En phase de latence, l'ADN persiste sous forme d'épisome circulaire et ne se réplique pas (Mellerick and Fraser, 1987). Le début du cycle lytique est quant à lui marqué par l'initiation de la transcription (Figure 5-6). Comme pour tous les alphaherpèsvirus, la transcription de l'HVE-1 se fait de manière séquentielle avec d'abord la transcription de gènes très précoces (immediate-early genes ; IE), suivi de celle de

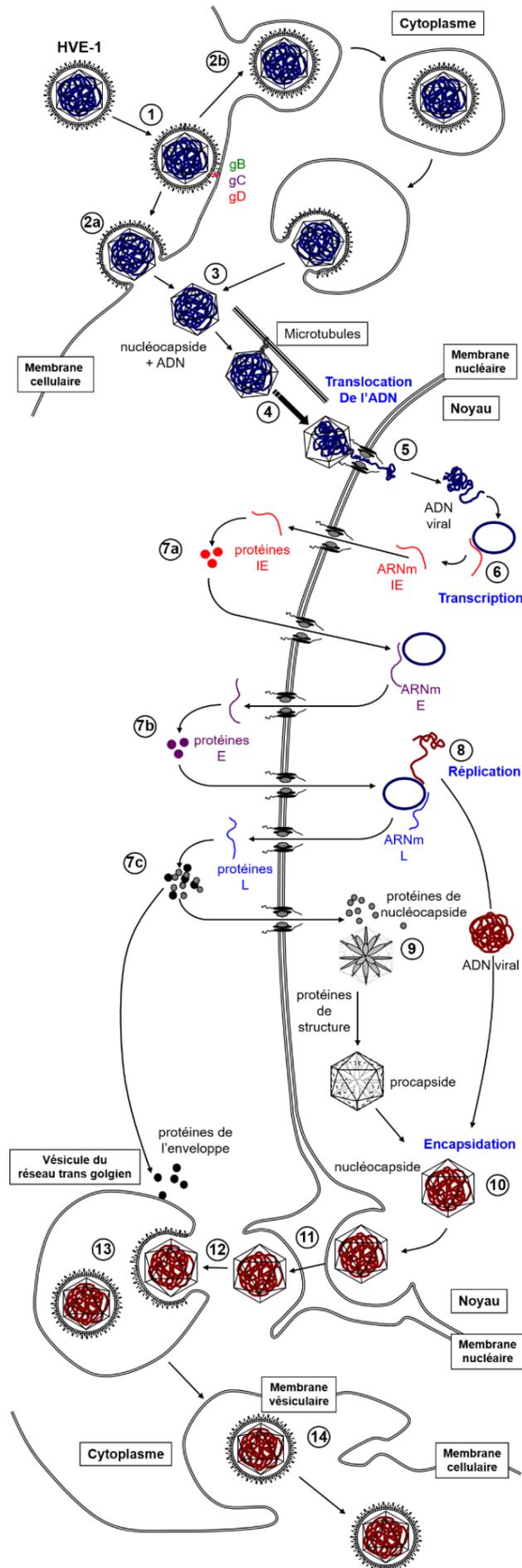


Figure 5 : Représentation schématique du cycle de réplication de l'herpèsvirus équin 1. (1) Attachement du virus à la cellule. (2) Pénétration du virus dans la cellule (2a) par fusion ou (2b) par endocytose. (3) La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme puis (4) transportée jusqu'au noyau via les microtubules. (5) Le génome viral est libéré dans le noyau. (6) Le génome viral se circularise puis une cascade de transcription est mise en place entraînant l'expression des immediate-early (IE ; 7a), early (E ; 7b) et late (L ; 7c) protéines. (8, 9, 10) Le génome est répliqué et intégré dans une capsidie néoformée. (11) La nucléocapside quitte le noyau par fusion avec la membrane nucléaire (12) pour être libérée dans le cytoplasme. (13) La nucléocapside acquiert son enveloppe virale dans le réseau trans-golgien. (14) La particule virale mature est excrétée dans l'espace extracellulaire par exocytose. Schéma adapté d'après Paillot et al., 2008.

55 gènes précoces (early genes ; E) et de 20 gènes tardifs (late genes ; L) (Gray et al., 1987a, 1987b; Purewal A. S. et al., 1994). La transcription débute grâce à la protéine du tégument α -trans-inducing factor (ETIF), acheminée dans la cellule par le virus. Celle-ci stimule la production des protéines IE (Figure 5-7a) (Elliott and O'Hare, 1995; Smith et al., 1992). Les gènes E sont à leur tour trans-activés par les protéines IE. Les gènes E codent principalement les enzymes nécessaires à la réplication du génome telles que l'ADN polymérase et la thymidine kinase virale (Figure 5-7b). Ils sont exprimés avant la réplication du génome viral et sont étroitement régulés par les protéines IE. Les gènes L, trans-activés par les protéines E codent principalement pour des protéines de structure, telles que les protéines de capsidie et les glycoprotéines de l'enveloppe (Figure 5-7c) et sont quant à eux exprimés après le début de la réplication virale (Figure 5-8) (Caughman et al., 1985; Gray et al., 1987a).

2.5. Assemblage et relargage des virions

Une fois les protéines de la capsidie synthétisées dans le cytoplasme, elles retournent dans le noyau pour initier leur assemblage (Figure 5-9). L'assemblage de la nucléocapsidie se fait à l'aide de protéines de structure permettant la formation d'une procapsidie sphérique (Newcomb et al., 1996). L'encapsidation de l'ADN viral survient après et provoque la libération des protéines de structure, permettant ainsi à la nucléocapsidie de prendre sa conformation polyédrique finale (Figure 5-10). Les nucléocapsides quittent ensuite le noyau par bourgeonnement au travers la membrane nucléaire interne et se retrouvent dans l'espace périnucléaire entourées d'une enveloppe primaire (Figure 5-11). La nucléocapsidie est ensuite libérée dans le cytoplasme par fusion de son enveloppe primaire avec la

membrane nucléaire externe (Figure 5-12) (Granzow et al., 2001). Le processus final d'enveloppement a lieu ensuite lorsque la nucléocapside bourgeonne dans les vésicules du réseau trans-golgien qui contient toutes les glycoprotéines virales membranaires (Figure 5-13). Les virions matures sont ensuite transportés à la surface des cellules dans des vésicules sécrétoires et libérés par exocytose dans l'espace extracellulaire (Figure 5-14) (Guo et al., 2010; Mettenleiter, 2002; Mettenleiter et al., 2009).

Les virus produits peuvent également infecter directement d'autres cellules par transmission directe de cellule à cellule. Les glycoprotéines gB (Wellington et al., 1996), gD (Csellner et al., 2000), gE/gI (Matsumura et al., 1998), gK (Neubauer and Osterrieder, 2004) et gH (Azab et al., 2012) sont impliquées dans ce processus. Ce mode de transmission permet à l'HVE-1 de se propager tout en échappant au système immunitaire.

3. Pathogenèse et symptômes induits par l'HVE-1

L'HVE-1 est un virus très contagieux chez les chevaux. Il se transmet généralement par contact direct *via* les sécrétions infectieuses (écoulements nasaux et salive) ou par inhalation d'aérosols infectieux (Patel et al., 1982). La contamination peut également se faire par contact direct avec les tissus fœtaux et placentaires, pouvant contenir d'importantes charges virales (Reed and Toribio, 2004).

3.1. Infection primaire du tractus respiratoire supérieur

Après inhalation de particules virales infectieuses, les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur du cheval se trouvent rapidement infectées par l'HVE-1. Le septum nasal, les cornets nasaux, le palais mou, le nasopharynx et la trachée sont généralement infectés (Gryspeerd et al., 2010). Le virus va alors se répliquer au sein de l'épithélium respiratoire en se propageant de cellule à cellule, provoquant différentes lésions. Ceci qui entraîne l'excrétion de particules virales pouvant durer 14 jours (Edington et al., 1986; Gryspeerd et al., 2010). Cependant, la stratégie de l'HVE-1 pour passer la membrane basale est différente de celles d'autres alphaherpèsvirus fortement étudiés. En effet, l'HSV-1, le BoHV-1 et le SuHV-1 franchissent la membrane basale et infectent les fibroblastes sous-jacents en se propageant de cellule à cellule (Glorieux et al., 2011b, 2011a; Steukers et al., 2012), contrairement à l'HVE-1 qui utilise les cellules immunitaires comme moyen de transport pour traverser la membrane basale (Vandekerckhove et al., 2011) (Figure 6). Il s'agit principalement des monocytes CD172a⁺ et des lymphocytes T CD5⁺ (Vandekerckhove et al., 2010; Zhao et al., 2017).

Les troubles respiratoires induits par l'HVE-1 chez les chevaux adultes sont généralement modérés à subcliniques. Les jeunes chevaux sont plus enclins à développer des troubles respiratoires. Cela se traduit généralement par de l'hyperthermie, du jetage nasal léger à mucopurulent (Figure 9A, 9B), de la toux légère, une lymphadénopathie des ganglions submandibulaires et rétropharyngés. Plus rarement des cas d'anorexie, de dépression et de jetages oculaires ont été observés (Lunn et al., 2009; Patel and Heldens, 2005). La

destruction des cellules épithéliales facilite également la mise en place d'une infection secondaire par des bactéries aggravant et prolongeant la durée des symptômes.

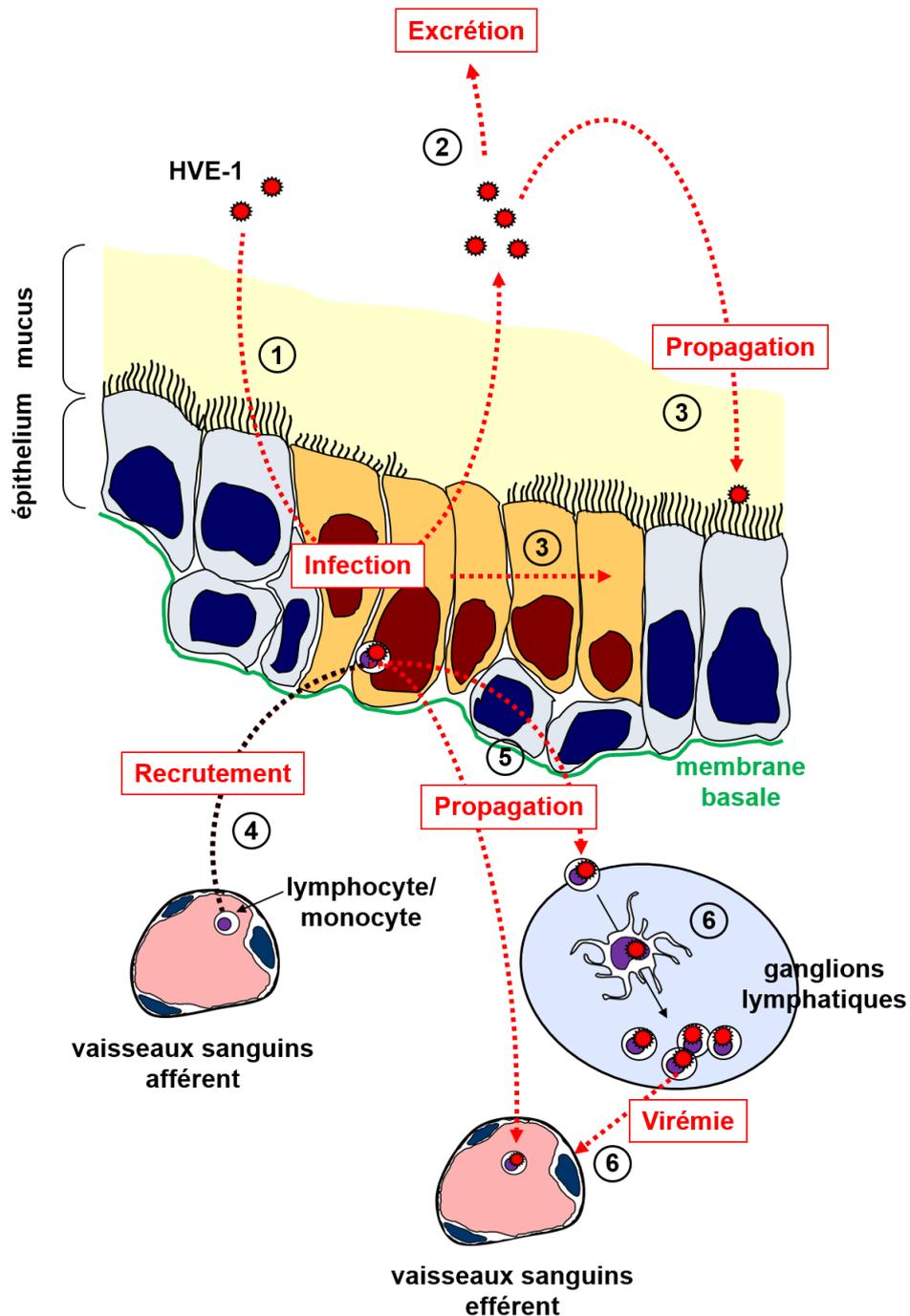


Figure 6 : Infection du tractus respiratoire supérieur par l'HVE-1 et diffusion du virus dans l'organisme. (1) L'HVE-1 se réplique dans les cellules épithéliales. Des particules virales (2) sont excrétées et (3) disséminent au sein du tractus respiratoire. (4) Des leucocytes sont recrutés pour venir défendre le site d'infection où ils se retrouvent infectés à leur tour par l'HVE-1. (5) Ces leucocytes infectés retournent dans la circulation sanguine ou lymphatique. (6) L'HVE-1 se multiplie ensuite dans les ganglions lymphatiques produisant des lymphocytes infectés. (7) Les lymphocytes infectés par l'HVE-1 sont libérés dans la circulation sanguine. Schéma adapté d'après Paillot et al., 2008.

3.2. Réplication dans les ganglions lymphatiques, mise en place de la virémie et latence

Après l'infection du tractus respiratoire, les leucocytes infectés transportent l'HVE-1 jusqu'aux ganglions lymphatiques *via* la circulation sanguine et lymphatique (Vandekerckhove et al., 2010). Une réplication virale secondaire a lieu dans ces ganglions, entraînant la libération d'un grand nombre de PBMCs infectées dans la circulation sanguine (Allen et al., 2004) (Figure 6), on parle alors de virémie cellulaire. Lors d'une infection expérimentale à HVE-1, des particules virales et des antigènes viraux ont été détectés dans les ganglions submandibulaires, retropharyngés et bronchiques 12 à 24 heures post-infection. La phase de virémie intervient généralement sous 48 heures et peut durer 14 jours (Slater et al., 1994). Toutefois, une virémie avec une faible charge virale peut se produire pendant une longue période après le pic de virémie, rendant la détection du virus difficile (Allen, 2006; Wilsterman et al., 2011). Elle permet au virus de se disséminer jusqu'aux organes cibles, que sont l'utérus, le système nerveux central (SNC) et les yeux (Figure 7). *In vitro*, l'ensemble des sous-populations de PBMCs peuvent être infectées par l'HVE-1 (Siedek et al., 1999). Cependant, les cellules monocytaires CD172a⁺, ainsi que les lymphocytes T et B sont les principaux leucocytes infectés par ce virus *in vivo* (Gryspeerdt et al., 2010; Laval et al., 2016; Scott et al., 1983). Par ailleurs, la majorité des PBMCs infectées n'expriment pas de protéines d'enveloppe virale à leur surface durant la phase de virémie (Gryspeerdt et al., 2012; Poelaert et al., 2019). Ceci suggère que l'HVE-1 utilise ces cellules comme un cheval de Troie afin de se disséminer dans l'organisme tout en évitant d'être reconnu par le système immunitaire (Poelaert et al., 2019).

3.3. Réplication secondaire dans les organes cibles

La phase de virémie *via* l'infection des PBMCs permet au virus d'infecter principalement trois organes distincts chez les équidés : le système reproducteur, le système nerveux central et le système oculaire. Au niveau de ces organes cibles, l'HVE-1 initie une réplication dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Le transfert de l'HVE-1 des PBMCs aux cellules endothéliales se fait par contact cellulaire direct sans passage du virus

dans le sang (Goehring et al., 2011; Smith and Borchers, 2001). En effet, Goehring et al. (2011) ont démontré que les anticorps neutralisants sanguins étaient incapables de bloquer le transfert du virus des PBMCs aux cellules endothéliales. Plus récemment, Spiesschaert et al. (2015) ont confirmé ces résultats par microscopie confocale et imagerie cellulaire. Ils ont d'ailleurs montré le rôle prépondérant de la gB pour le passage de l'HVE-1 de la surface des PBMCs aux cellules endothéliales.

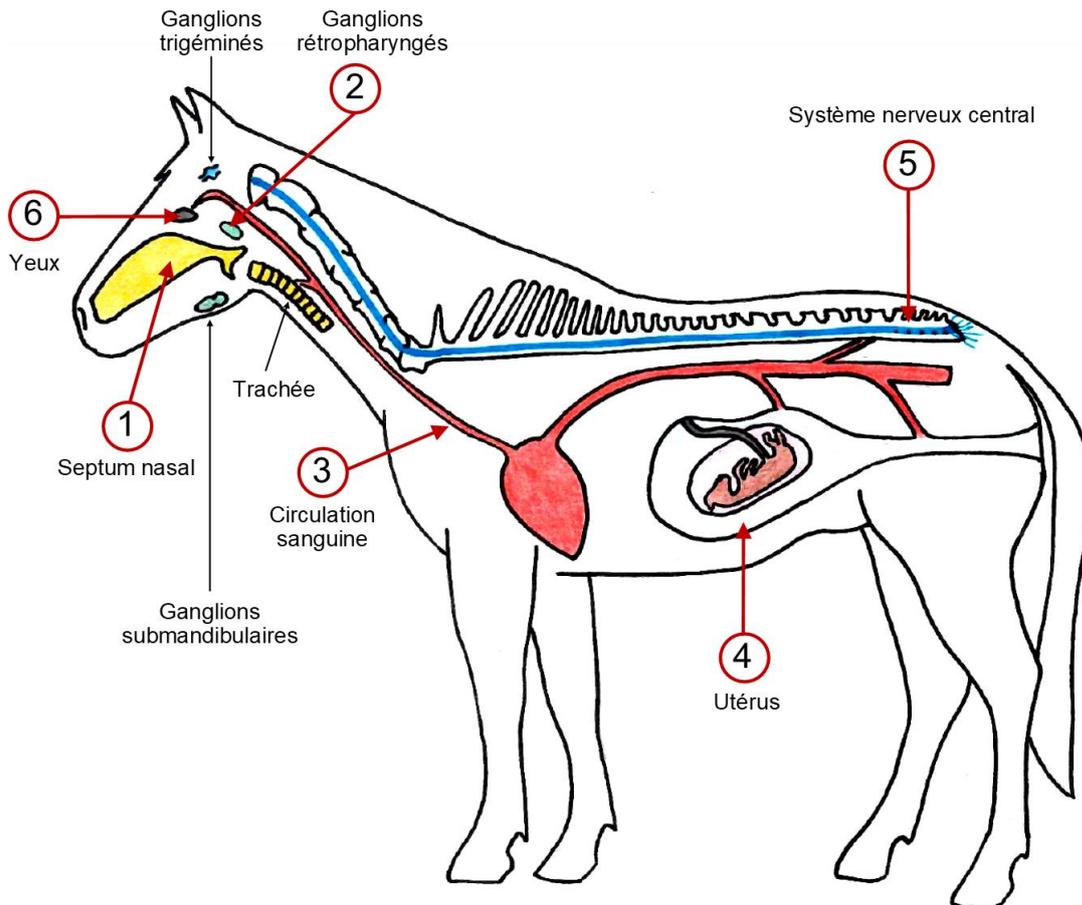


Figure 7 : Représentation schématique de la dissémination de l'HVE-1 chez le cheval. La réplication virale primaire se produit dans l'épithélium des voies respiratoires supérieures (1). Les cellules immunitaires infectées atteignent les ganglions lymphatiques (2) et entrent dans la circulation sanguine (3). Par le biais de la virémie cellulaire, les PBMCs infectées atteignent les organes cibles que sont l'utérus des juments (4), le système nerveux central (5) et les yeux (6) où elles transmettent l'HVE-1 aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Le tractus respiratoire supérieur est représenté en jaune, les ganglions lymphatiques en vert, la circulation sanguine en rouge, le fœtus en marron, le système nerveux en bleu et le système oculaire en gris. Source : A. Musso.

3.3.1. Système reproducteur

Une fois infectées par l'HVE-1, les juments peuvent présenter de la fièvre et des symptômes respiratoires légers mais aussi avorter sans aucun prodrome (Allen, 2002). La réplication secondaire de l'HVE-1 dans les cellules endothéliales de l'utérus peut provoquer une vascularite, une thrombose multifocale et une nécrose ischémique (Edington et al., 1991; Smith et al., 1996). Ces dégradations sont causées par deux mécanismes qui sont les lésions directes des cellules endothéliales qui tapissent les petits vaisseaux sanguins ainsi que la formation et le dépôt de complexes immuns du virus HVE-1 et d'anticorps (réaction de type Arthus) (Reed and Toribio, 2004). La présence d'un grand nombre de ces lésions entraîne une séparation prématurée entre le placenta et le fœtus provoquant la mort de ce dernier par anoxie. L'avorton n'est alors pas contaminé par l'HVE-1 (Foote et al., 2012) (Figure 8). Cependant, le fœtus peut se retrouver infecté par l'HVE-1 suite à des lésions utéro-vasculaires plus légères, permettant au virus de traverser la membrane utéroplacentaire (Edington et al., 1991). Dans ces conditions, du virus est généralement retrouvé dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du cordon ombilical et de l'allantochorion (Figure 8) (Smith et al., 1997, 1993). Les fœtus avortés présentent de multiples lésions macroscopiques et microscopiques telles qu'une nécrose hépatique multifocale, des œdèmes sous-cutanés et pulmonaires, un épanchement pleural et un grossissement de la rate (Machida et al., 1997). Il a été démontré que les avortements surviennent majoritairement durant les 4 derniers mois de gestation (Figure 9C) (Allen and Bryans, 1986; Léon et al., 2008). L'infection d'une jument ou la réactivation du virus à un stade avancé de la gestation peut induire la naissance prématurée du poulain. La plupart de ces poulains sont faibles, présentent des problèmes respiratoires et meurent généralement dans les 7 jours *post-partum*, on parle alors de « maladie néonatale du poulain » (Gerst et al., 2003; Murray et al., 1998) (Figure 9D). L'HVE-1 est considéré comme la première cause virale d'avortement chez la jument (Laugier et al., 2011; Léon et al., 2008). Suite à l'avortement, le virus est naturellement et rapidement éliminé du tractus génital et la fertilité de la jument n'est pas altérée (Allen et al., 2004).

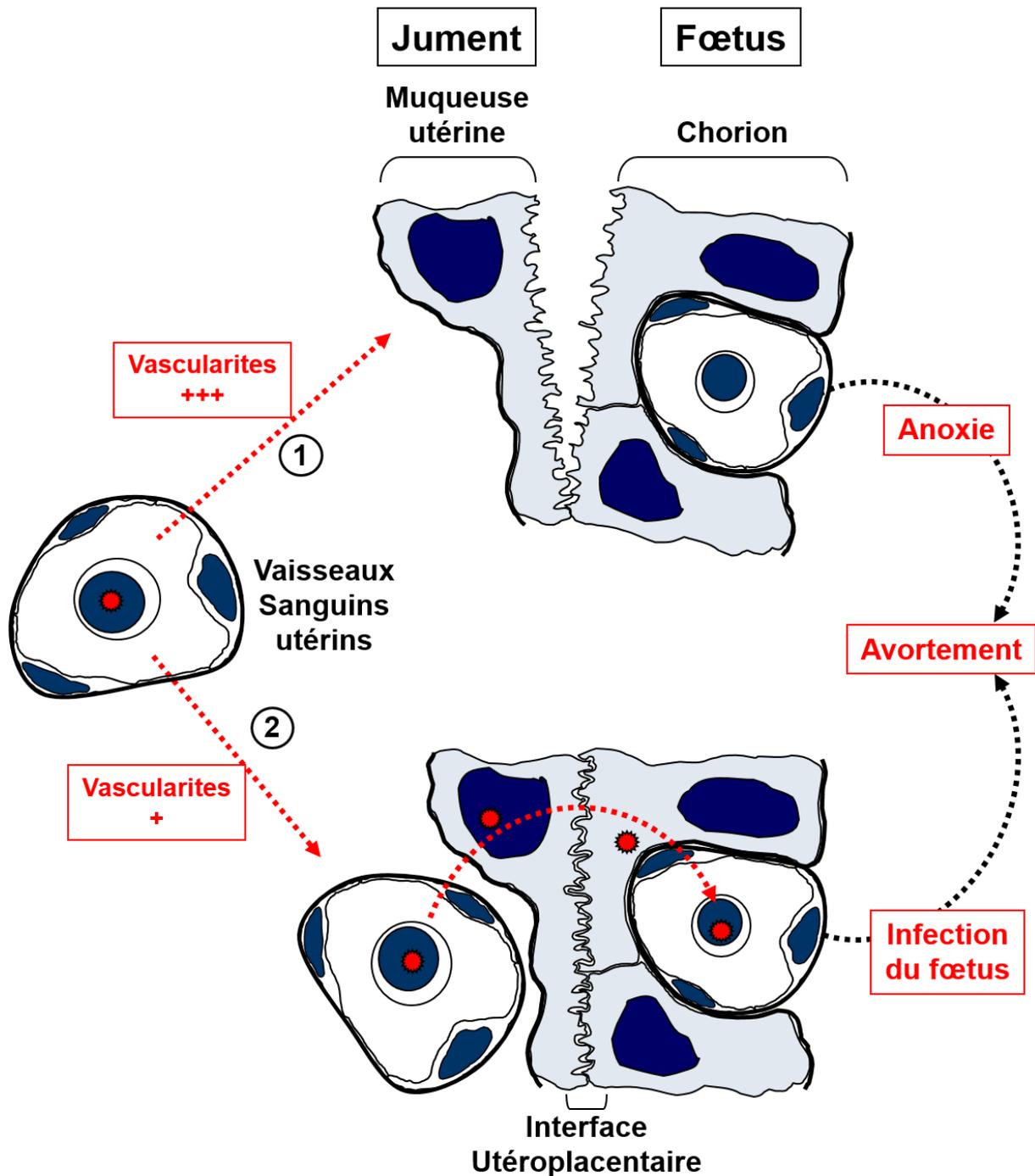


Figure 8 : Transmission de l'HVE-1 de la jument au fœtus. Les lymphocytes maternels infectés par l'HVE-1 atteignent les vaisseaux sanguins utérins pendant la phase de virémie. (1) L'infection des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de l'utérus provoque des vascularites, entraînant une séparation prématurée du placenta et une mort par anoxie du fœtus. (2) Des lésions moins importantes permettent au virus de passer à travers la membrane utéroplacentaire pour infecter les lymphocytes fœtaux et entraîner l'avortement. Schéma adapté d'après Paillot et al., 2008.

3.3.2. Système nerveux central

L'HVE-1 peut également se répliquer au sein des cellules endothéliales du système nerveux central (SNC) provoquant une inflammation avec ou sans hémorragie locale, ainsi qu'une nécrose ischémique dans le cerveau et la moelle épinière (Edington et al., 1986). Le manque d'apports en nutriments et en oxygène peut conduire à une dégénérescence des tissus nerveux, induisant la myéloencéphalopathie herpétique équine (MHE) (Wilson, 1997) (Figure 9E).

Plusieurs équipes ont essayé de déterminer les facteurs prédisposant au développement de MHE. Il semblerait que les femelles et les chevaux âgés de plus de cinq ans soient les plus à risque (Allen, 2008; Goehring et al., 2006; Henninger et al., 2007; Pusterla et al., 2016; van Galen et al., 2015). Par ailleurs, la saison semble impacter, avec plus de cas déclarés en hiver et au printemps (Goehring et al., 2006; Van Cleemput et al., 2019; Wilson, 1997). Enfin, le type de souche incriminée semble être un facteur important pour le développement de MHE (Nugent et al., 2006) (voir partie 3.5). Les signes cliniques varient d'une légère ataxie jusqu'à la paralysie totale de l'animal. Les chevaux atteints de MHE peuvent présenter une incontinence urinaire, un port de tête bas, un œdème distal au niveau des membres et des testicules, une paralysie de la queue ainsi que de la cécité (van Maanen, 2002). Les symptômes de la MHE apparaissent généralement entre 6 et 8 jours post-infection (Goehring et al., 2010; Jackson and Kendrick, 1971). Le pronostic pour les chevaux qui ne se couchent pas suite à l'apparition de la MHE est souvent favorable mais il faut généralement plusieurs mois pour un rétablissement total. En revanche, les chevaux couchés développent dans la majorité des cas des complications conduisant à leur euthanasie.

3.3.3. Système oculaire

La réplication secondaire de l'HVE-1 dans le système vasculaire oculaire des chevaux peut provoquer des lésions chorioretiniennes multifocales comme la chorioretinite et l'uvéite (Slater et al., 1992). La plupart de ces lésions sont subcliniques mais sont également observées comme entraînant une destruction de la rétine et la cécité. Les premiers cas de chorioretinite induits par HVE-1 ont été décrits sur des lamas et des alpagas infectés expérimentalement (House et al., 1991; Rebhun et al., 1988). Les premiers cas chez les chevaux ont été constatés chez une jument et un poulain lors d'un foyer infectieux en 1992

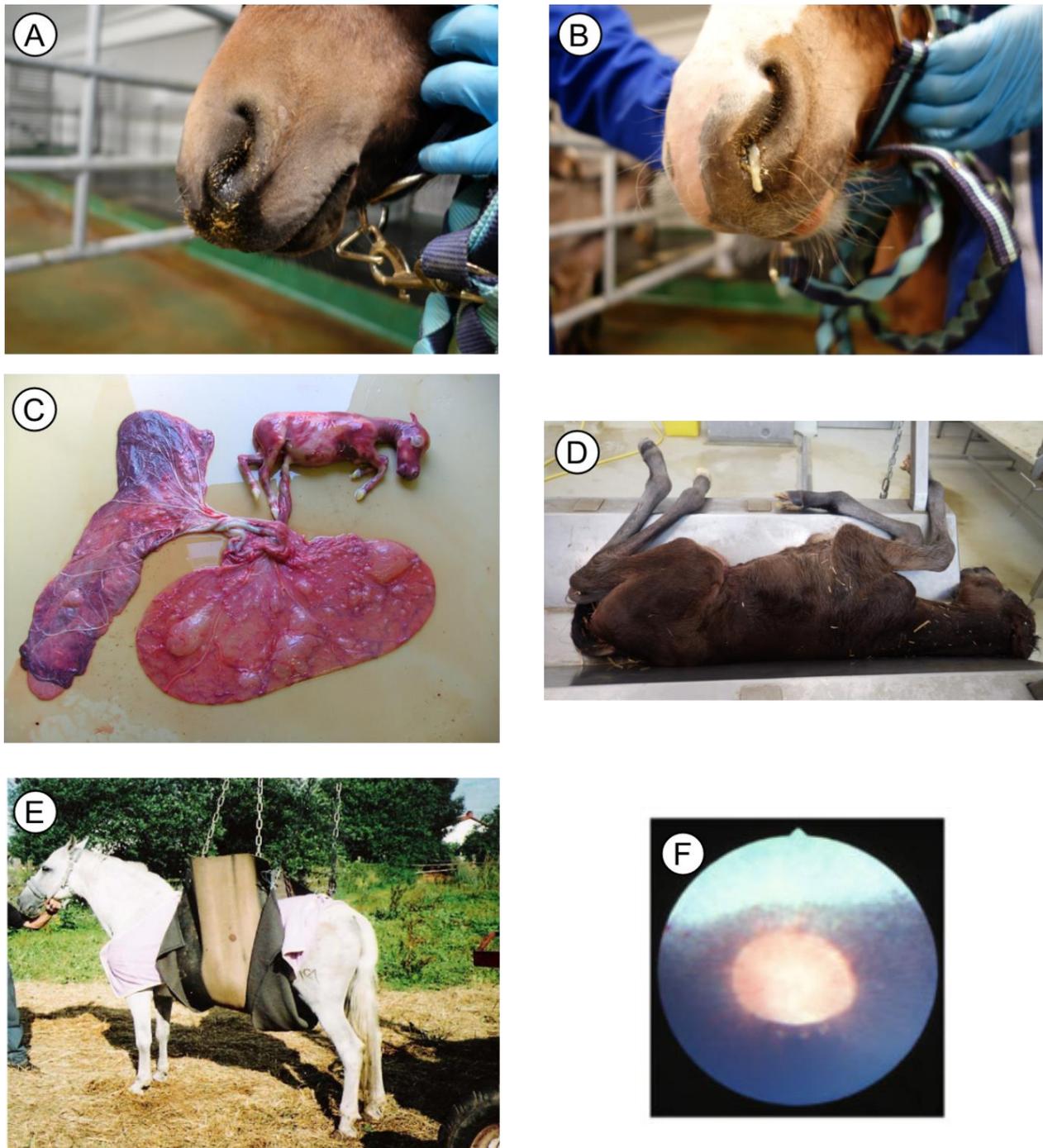


Figure 9 : Principaux signes cliniques associés à une infection par l'HVE-1 chez le cheval. Troubles respiratoires caractérisés par un jetage nasal léger (A) ou mucopurulent (B), avortement (C), mort néonatale du poulain (D), myéloencéphalopathie herpétique équine (E) et choriorétinite (F). Les photos A et B ont été prises durant une infection expérimentale à la Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale de l'INRAE de Nouzilly. Les photos C et D sont fournies par le laboratoire de pathologie équine de Dozulé, ANSES. La photo C est fournie par le Dr. Pierre Tritz. La photo F est tirée de l'article Hussey et al., 2013.

(Whitwell and Blunden, 1992). Plus récemment, il a été démontré que 50 à 90 % des chevaux présentaient des lésions chorio-rétiniennes lors d'une infection expérimentale à HVE-1 (Hussey et al., 2013). Ces lésions peuvent être observées par ophtalmoscopie entre le 20^{ème} et le 111^{ème} jour post infection (Figure 9F) mais peu de cas sont rapportés sur le terrain, peut-être à cause d'un manque d'investigation au niveau de la sphère oculaire.

3.4. Latence et réactivation

Comme tous les herpèsvirus, l'HVE-1 présente une phase de latence au sein de l'organisme. Cette latence est la stratégie principale permettant au virus d'assurer sa survie et sa propagation au sein de l'hôte. Durant cette période, les chevaux infectés ne présentent aucun signe clinique et le virus n'est généralement pas retrouvé dans le sang (Allen et al., 2004). Après une première réplication dans le tractus respiratoire supérieur, il se propage dans les cellules telles que les leucocytes et les neurones. Il a été démontré que les lymphocytes CD8+ et les neurones du ganglion trigéminal sont les principaux sites de latence (Baxi et al., 1995; Chesters et al., 1997; Slater et al., 1994; Welch et al., 1992). La mise en place de la latence se fait par circularisation du génome qui forme alors un épisode associé aux histones (Deshmane and Fraser, 1989). Pendant la phase de latence, l'ADN viral de l'HVE-1 est copié par les ADN polymérases cellulaires pendant la mitose. Durant cette période l'expression du génome viral est réprimée et seuls les ARN viraux codant pour des gènes IE, également appelé transcrits associés à la latence (LATs), sont retrouvés dans ces cellules (Paillot et al., 2008; Roizmann et al., 1992).

La réactivation de l'HVE-1 peut se faire à n'importe quel moment de la vie du cheval mais elle survient généralement suite à l'administration de corticostéroïdes (Edington et al., 1985) ou suite à une période de stress, tel que le transport, le sevrage ou la castration (Gibson et al., 1992; Slater et al., 1994; Smith et al., 1998) Suite à une phase de réactivation, l'HVE-1 migre dans les voies respiratoires et initie alors une nouvelle réplication lytique dans les cellules épithéliales en l'absence de statut immunitaire protecteur. Cette réplication induit l'excrétion de nouvelles particules virales infectieuses dans les liquides biologiques. Par ailleurs, la réactivation de l'HVE-1 induit une nouvelle phase de virémie entraînant la dissémination du virus jusqu'aux organes cibles, provoquant les formes cliniques secondaires

graves (avortements, MHE). Il a été démontré, lors d'une infection expérimentale, qu'une souche mutante d'HVE-1 en latence, délétée en thymidine kinase, n'est pas capable d'induire sa réactivation (Slater et al., 1993).

La prévalence de l'HVE-1 à l'état latent au sein des populations équine mondiale est variable. Il n'existe d'ailleurs que peu d'études évaluant la prévalence *post-mortem* de l'HVE-1 dans le monde. En Europe, l'isolement de l'HVE-1 a pu être réalisé sur 60% des prélèvements de ganglions bronchiques équins (Edington et al., 1994). Tandis que ce virus a été détecté dans 88% des mêmes échantillons en utilisant une PCR conventionnelle. L'infection latente par HVE-1 dans les ganglions rétropharyngés a été détectée chez 72% (Allen, 2006) et 54% (Allen et al., 2008) de chevaux du Kentucky à l'aide d'une technique utilisant des billes magnétiques couplées à une *nested*-PCR. Dunowska et al. (2015) ont montré que 33% des chevaux de Nouvelle-Zélande étaient positifs à l'HVE-1 lorsqu'il est recherché dans les ganglions trigémiques et rétropharyngés en utilisant cette même technique. Pusterla et al. (2010) ont montré que seulement 15% des chevaux de Californie étaient positifs à l'HVE-1 lorsqu'il était recherché dans les ganglions submandibulaires et trigémiques par PCR en temps réel. Et que 25,7 % l'étaient lorsque l'HVE-1 est recherché dans les ganglions submandibulaires, bronchiques et trigémiques en utilisant cette même technique (Pusterla et al., 2012). La prévalence de l'HVE-1 semble influencée par la région géographique, mais les méthodes de détection et les tissus prélevés influencent fortement la sensibilité des tests de détection. Bien que le peu de données collectées actuellement sont hétérogènes, la prévalence actuelle de l'infection latente par HVE-1 au sein de la population équine est estimée comme étant supérieure à 60% (Lunn et al., 2009).

3.5. Virulence des souches

Les différentes formes de la maladie, la nature et la sévérité des symptômes induits par l'HVE-1 dépendent de plusieurs facteurs comme l'âge de l'animal, son statut immunitaire et son état de santé général mais également de la variabilité des souches d'HVE-1 incriminées. Une variation de virulence a été décrite entre différentes souches d'HVE-1 isolées. En effet, certaines souches sont connues pour entraîner une forte virémie et induire un taux élevé d'avortements et des formes nerveuses (MHE) (Smith et al., 2000). C'est en

2006 que Nugent et al. ont démontré que le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) dans la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase virale, provoquant la substitution d'une guanine (G₂₂₅₄) en adénine (A₂₂₅₄) et entraînant le changement de l'acide aminé en position 752 (acide asparagine (N₇₅₂) en acide aspartique (D₇₅₂)) était significativement associé aux troubles nerveux provoqués par l'HVE-1 (Nugent et al., 2006). Cette étude a montré que plus de 95% des foyers à HVE-1 sans troubles nerveux étaient causés par des souches dites non-neuropathogène (A₂₂₅₄) tandis que plus de 86% des foyers avec des chevaux présentant des troubles nerveux étaient causés par des souches dites neuropathogènes (G₂₂₅₄). Goodman et al. (2007) ont confirmé par des expériences de mutagenèse dirigée que les souches présentant cette substitution étaient significativement associées à des troubles nerveux. Cependant, des souches ne présentant pas cette mutation ont également été isolées de chevaux qui ne présentaient pas de troubles nerveux (Allen, 2008). Bien que ce ne soit pas exclusif, les souches A₂₂₅₄ sont fréquemment associées à des avortements, tandis que les souches G₂₂₅₄ sont associées aux troubles nerveux (Gryspeerd et al., 2010; Nugent et al., 2006). Des travaux de recherche incluant d'importants panels d'échantillons collectés sur le terrain ont été réalisés dans de nombreux pays, remettant en cause l'importance de cette mutation sur la virulence des souches (Perkins et al., 2009; Pronost et al., 2010; Smith et al., 2010; Sutton et al., 2019; Vissani et al., 2009).

4. Modèles d'étude de l'HVE-1

Plusieurs modèles d'études ont été développés pour étudier l'HVE-1 (Figure 10). Les principaux avantages et inconvénients de chacun de ces modèles sont détaillés ci-dessous.

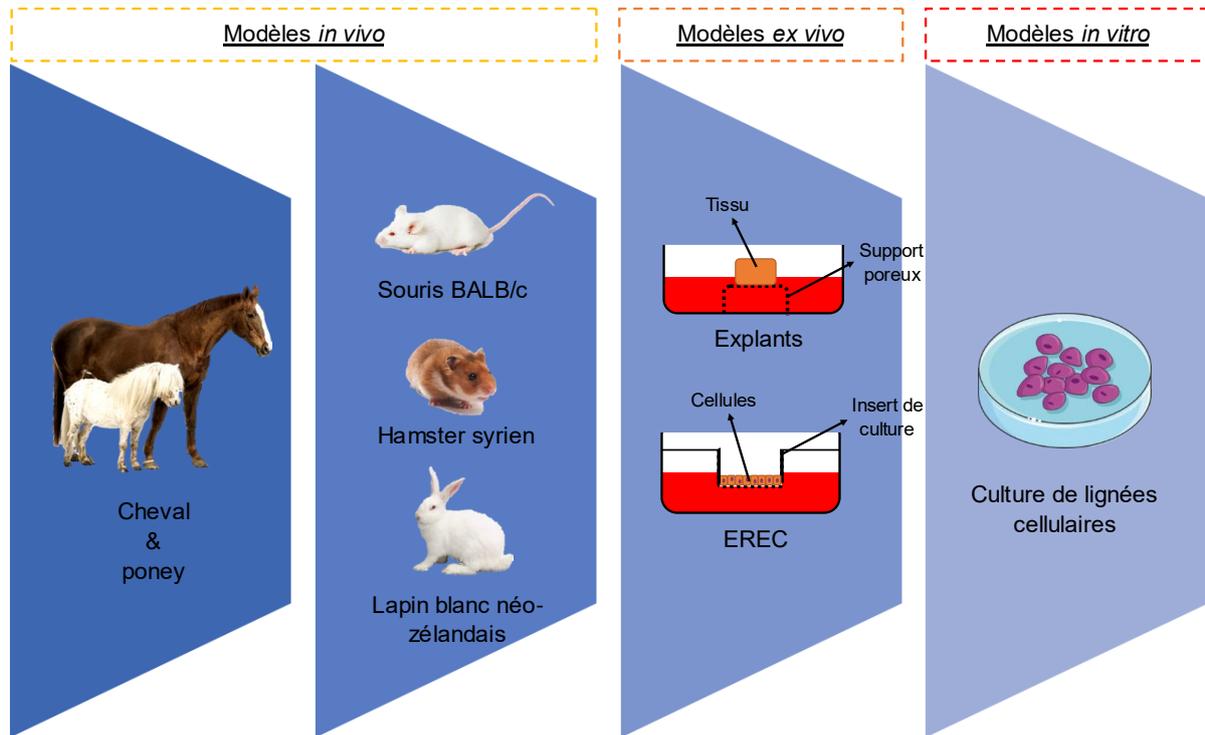


Figure 10 : Représentation schématique de l'ensemble des modèles d'étude utilisés pour étudier l'HVE-1.

4.1. Culture de lignées cellulaires

Les premières cultures de cellules en laboratoires ont été réalisées par Harrison, en 1907 lors de recherches sur l'origine des fibres nerveuses. Depuis, cette méthode a été améliorée et est utilisée pour isoler et évaluer l'effet de nombreux virus. La culture *in vitro* sur lignées cellulaires est le modèle d'étude de l'HVE-1 le plus utilisé. Comme c'est un virus très permissif, différentes lignées cellulaires sont utilisées pour le cultiver. Nous pouvons citer plusieurs modèles équin, tels que les cellules dermiques équines (ED ; E. Derm), les cellules pulmonaires d'embryon équin (EEL) et les cellules rénales d'embryon équin (EEK). Mais des lignées provenant d'autres espèces animales sont également utilisées telles que les cellules rénales de lapin (RK13) et les cellules épithéliales de rein de porc (PK15). Ce type de modèle

est peu coûteux, facile à mettre en place et à maîtriser. Golke et al. (2012) ont utilisé la technologie Real Time Cell Analysis (RTCA) xCELLigence®, basée sur le principe de mesure d'impédance cellulaire, pour suivre l'infection de l'HVE-1 sur cellules ED. Les résultats préliminaires obtenus lors de cette étude ont montré pour la première fois la capacité de cette technologie pour suivre en temps réel l'infection de ces cellules. Le principe de cette technologie, au cœur de ce travail de thèse, est détaillé dans la partie « 3. Résultats ». Malgré ces avantages, la culture de lignées cellulaires en laboratoire présente de nombreuses limitations. En effet, ces modèles ne reproduisent pas la structure et les conditions naturelles des tissus. De plus, l'isolement des cellules du tissu et leur transfert aux conditions bidimensionnelles, entraînent une modification de leur morphologie, de leur mode de division, de leur organisation structurale ainsi qu'une perte de leur polarité (Kapałczyńska et al., 2016). Face à l'ensemble de ces inconvénients, des systèmes alternatifs ont été développés afin de se rapprocher au mieux des conditions naturelles.

4.2. Culture *ex vivo* d'explants de muqueuse respiratoire

Les modèles d'explants des voies respiratoires sont devenus des outils clés de plus en plus utilisés pour l'étude des voies respiratoires. Les avantages de ce modèle sont la structure tridimensionnelle avec de multiples interactions intercellulaires et la diversité cellulaire se rapprochant le plus des conditions *in vivo*. Une caractéristique importante de la culture d'explants de muqueuse respiratoire est l'interface air-liquide, qui imite les conditions *in vivo*, dans lesquelles la surface basolatérale de la muqueuse est en contact avec le milieu, tandis que la surface apicale de l'épithélium est exposée à l'air.

Carleton (1925) fut le premier à décrire l'utilisation d'explants de voies respiratoires à partir de fœtus de lapin et de tissus d'adultes. Ce modèle a été optimisé à la fin des années 1950 pour étudier la pathogénèse des virus respiratoires, tels que les virus influenza, poliovirus et herpèsvirus (Bang and Niven, 1958; Barski et al., 1957). Ce modèle a ensuite été repris sur de nombreuses espèces (Pol and Broekhuysen-Davies, 1991). Une équipe belge a réussi à maintenir en culture des explants de muqueuses respiratoires pendant 4 à 7 jours sans changement significatif de la morphologie et de la viabilité cellulaire (Glorieux et al., 2007; Wallner et al., 2005). Ces cultures ont permis d'étudier avec succès l'invasion et la

réplication des HVE-1, HVE-3 et HVE-4, la réponse et la migration des cellules mononucléaires pendant une infection à HVE-1 et de nombreux autres paramètres (Kamel et al., 2019; Negussie et al., 2016; Vandekerckhove et al., 2011). Cependant, ce modèle présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, il est nécessaire d'avoir accès rapidement à des trachées ou des cloisons nasales de chevaux en bonne santé fraîchement prélevées. De plus, l'isolement, la culture et le traitement de ces explants sont chronophages. Par ailleurs, les propriétés des explants dépendent entièrement de la qualité du tissu dont est issu la biopsie. Il est donc difficile de contrôler les caractéristiques des échantillons, ce qui entraîne souvent de grandes variations dans les résultats (Papazian et al., 2016).

4.3. Culture primaire de cellules épithéliales respiratoires équines

Certaines des limitations du modèle d'explant peuvent être surmontées par l'utilisation de cellules primaires épithéliales respiratoires équines (ERECs) comme modèle alternatif ou complémentaire afin d'étudier la pathogénèse de l'HVE-1 (Kamel et al., 2019; Poelaert et al., 2018; Quintana et al., 2011). En effet la culture d'ERECs permet de travailler dans des conditions plus standardisées mais souffre également de la variabilité du donneur, diminuant la reproductibilité des résultats (Papazian et al., 2016). Les ERECs sont cultivées sur des inserts poreux en polyester, permettant la culture dans une interface air-liquide. Cela crée un environnement proche des conditions physiologiques (Forbes and Ehrhardt, 2005; Grainger et al., 2006). La culture d'ERECs et d'explants sont aujourd'hui les modèles qui reproduisent le mieux en laboratoire les conditions *in vivo* de la primo-infection. En effet, la plupart des données relatives à l'HVE-1 obtenues à partir de ces modèles concordent avec les données obtenues *in vivo* (Ma et al., 2012; Soboll Hussey et al., 2011; Thormann et al., 2012).

4.4. Modèle d'étude en flux dynamique

Afin d'évaluer en mode dynamique l'interaction entre les PBMCs et les cellules endothéliales, un système de flux dynamique a été développés (Kamel et al., 2019; Spiesschaert et al., 2015). Ce système permet aux PBMCs infectés de circuler « par roulement » sur une monocouche de cellules endothéliales en présence ou en absence

d'anticorps neutralisants anti-HVE-1. Couplé à de la microscopie à fluorescence, ce système a notamment pu être utilisé pour évaluer les différences entre les souches d'HVE-1 dites neuropathogènes et non-neuropathogènes (Spiesschaert et al., 2015). Grâce à cette technologie et à l'utilisation de différents mutants, le rôle de différentes protéines virales dans le transfert de l'HVE-1 aux cellules endothéliales, telles que la gB, la gD, les ORF 1, 2 et 3 a été étudié (Azab, 2019).

4.5. Modèles petits animaux

Plusieurs modèles petits animaux ont été utilisés pour étudier la pathogénicité de l'HVE-1. Le modèle souris a été largement utilisé pour étudier différents aspects de l'infection à HVE-1, tels que les symptômes respiratoires (Awan et al., 1990), la latence, la réactivation du virus (Baxi et al., 1996), les signes neurologiques (Mori et al., 2012) et les avortements (Awan et al., 1991). Les souris BALB/c ont également été utilisées pour étudier l'effet de vaccins (Osterrieder et al., 1995). Le modèle hamster syrien a été utilisé très tôt pour isoler et étudier les effets du « equine abortion virus », connu plus tard sous le nom de HVE-1 (Anderson and Goodpasture, 1942; Doll et al., 1956). L'HVE-1 se réplique dans le foie et les poumons des hamsters inoculés par voie intranasale et intrapéritonéales (Stokes et al., 1989). Les hamsters semblent plus à même de développer des signes neurologiques par rapport aux souris BALB/c (Ono et al., 1998). Par ailleurs, le modèle hamster a été fortement utilisé pour évaluer la pathogénèse de l'HVE-9, phylogénétiquement très proche de l'HVE-1 (El-Habashi et al., 2019, 2011a, 2011b, 2010; El-Nahass et al., 2011; Fukushi et al., 2000). Bien que ces modèles semblent intéressants pour étudier la pathogénicité de l'HVE-1, aucune étude scientifique n'a encore fait la preuve de l'infection et la propagation de l'HVE-1 chez ces animaux dans les conditions naturelles. Ces modèles ne parviennent généralement pas à reproduire certains aspects essentiels de l'infection à HVE-1 chez les chevaux. Plus récemment, une équipe brésilienne a investigué l'utilisation du lapin blanc néo-zélandais comme modèle d'étude de l'HVE-1 (Kanitz et al., 2015). Les résultats de cette étude montrent que les lapins sont sensibles à une infection à HVE-1 et développent des signes respiratoires et neurologiques. De plus, de l'ADN latent a été retrouvé dans le cortex cérébral de certains lapins. Ces premières données montrent que ce modèle d'étude est prometteur pour étudier

l'HVE-1, mais des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre la pathogénicité de l'HVE-1.

4.6. Modèle équin

Le cheval est le modèle animal de référence pour étudier l'ensemble des herpèsvirus équins (Goehring et al., 2010). Cependant, l'utilisation de ce modèle est très coûteuse, nécessite des installations adaptées pour veiller à une bonne biosécurité ainsi qu'un personnel animalier maîtrisant ce modèle. Par ailleurs, il faut noter qu'il est nécessaire d'utiliser de nombreux chevaux pour avoir des résultats significativement interprétables. Pour faciliter la prise en main des animaux, des poneys sont généralement utilisés lors d'études expérimentales (Garré et al., 2009; Paillot et al., 2010; Soboll et al., 2010, 2006). En raison des difficultés financières et éthiques associées à l'infection expérimentale chez les équidés, les modèles petits animaux et *in vitro* constituent depuis de nombreuses années les approches alternatives les plus utilisées pour l'étude de la pathogénicité de l'HVE-1.

5. Surveillance et moyens de lutte contre l'HVE-1

5.1. Mesures de prévention

L'éradication de l'HVE-1 et des autres herpèsvirus équins ne semble pas possible aujourd'hui en raison de leur omniprésence au sein des populations équines et de leur capacité à rester à l'état latent. La prévention constitue donc aujourd'hui, plutôt que le traitement, le moyen de lutte le plus efficace contre ce virus. Cette prophylaxie repose principalement sur une gestion efficace des animaux d'élevage, une bonne hygiène au quotidien et une vaccination régulière. Ces bonnes pratiques ont été publiées par Allen (2002) et sont mises à jour régulièrement lors des réunions de consensus du groupe d'experts (Lunn et al., 2009). De plus ces recommandations de bonnes pratiques sont à disposition des acteurs de la filière sur des sites spécialisés. En France c'est le RESPE (Réseau d'Epidémiologie et de Surveillance en Pathologie Equine) qui fait le relai auprès des vétérinaires et éleveurs en publiant les guides de bonnes pratiques. Le RESPE est également en charge de la publication des informations sur la circulation des virus, informations obtenues grâce à son réseau de plus de 800 vétérinaires et l'appui de laboratoires de diagnostic (<https://respe.net/>). C'est également cette structure qui intervient en cas de crise de rhinopneumonie en France comme cela a été le cas en 2018 (Sutton et al., 2019). En Angleterre, ces informations sont publiées dans le Code of Practice du Horserace Betting Levy Board (<https://codes.hblb.org.uk/index.php/page/2>) et aux Etats-Unis sur le site de l'American Association of Equine Practitioners (<https://aaep.org/>).

5.1.1 Management

Tous les chevaux, y compris les poulains, constituent une source de propagation. Le troupeau doit donc être géré de manière à minimiser le risque de contamination entre les chevaux. La subdivision de la population en petits groupes et le maintien de ces groupes en tant qu'unités fermées et physiquement séparées réduit efficacement le risque d'apparition de foyers infectieux à HVE-1. Ces groupes doivent être constitués en fonction de l'âge, de la fréquence de sortie des individus et du stade de gestation pour les juments. Il faut restreindre au maximum les mouvements des chevaux entre les groupes. Par ailleurs, les contacts avec des chevaux de passage doivent être limités. La principale source de contamination par des virus exogènes est l'introduction de nouveaux chevaux dans les groupes établis. Les individus

les plus à risque sont ceux participant à de grands rassemblements tels que les compétitions équestres et les lieux de vente. En effet, l'introduction de chevaux au sein d'un troupeau a été plusieurs fois signalée avant l'apparition de foyers d'HVE-1 (Goehring et al., 2006; Henninger et al., 2007; van Maanen et al., 2001). L'ajout d'un nouvel individu dans un effectif doit être précédé d'une période d'isolement d'au moins 21 jours (Lunn et al., 2009). Une évaluation des signes pouvant traduire un état infectieux couplée à des tests diagnostiques en laboratoire est conseillée afin de réduire les risques. Il est également important de réduire les risques de réactivation des virus latents au sein des groupes en réduisant les éléments facteurs de stress. L'ensemble de ces mesures de management est à prendre encore plus au sérieux pour les juments gestantes. En effet, toute jument ayant avorté doit être isolée de l'élevage avant d'y être réintroduite. Cet isolement doit persister jusqu'à ce qu'il soit prouvé que l'HVE-1 n'en est pas la cause. Allen et al. (2004) ont d'ailleurs introduit l'acronyme SISS pour décrire brièvement les mesures à prendre pour prévenir les foyers infectieux à HVE-1 chez les juments gestantes : I) Ségrégation : séparation des juments gestantes des autres chevaux, II) Isolement : isolement des chevaux nouvellement introduits sur une période de 21 jours, III) Subdivision : subdiviser les juments gestantes en groupes distincts pendant toute la durée de la gestation et IV) Réduction du stress: réduire le stress par une bonne gestion, une bonne nutrition, des soins médicaux adaptés, en évitant le sevrage de masse et en réduisant les déplacements. Ces mesures sont également adaptables à toutes les populations équines (Allen, 2002). Comme le personnel constitue une source potentielle de contamination, un système de marche en avant doit être mis en place. Il est également à noter que l'HVE-1 peut survivre dans l'eau pendant au moins 21 jours (Baunassie, 2019; Dayaram et al., 2017). Il faut donc éviter d'utiliser ou de déplacer les systèmes d'abreuvoirs entre les groupes et gérer les effluents lors du nettoyage suite à un avortement.

5.1.2. Vaccination

La vaccination, couplée aux mesures de management, constitue une des stratégies les plus importantes de lutte contre l'HVE-1. Un vaccin efficace doit être capable de I) réduire la réplication virale au sein du tractus respiratoire supérieur, réduisant ainsi l'excrétion virale et les symptômes respiratoires et II) réduire, voire empêcher la réactivation du virus, limitant la virémie cellulaire et empêchant ainsi l'apparition des formes secondaires que sont les avortements et les formes nerveuses (Paillot et al., 2008). Depuis l'introduction des premiers

vaccins contre l’HVE-1 dans les années 1960, des recherches approfondies ont permis la mise en place de nombreux vaccins efficaces, majoritairement inactivés. Ces vaccins présentent l’avantage de ne posséder aucune pathogénicité et n’induisent pas la réplication du virus au sein de l’hôte. Des vaccins à ADN, des vaccins vivants atténués et des vaccins vivants recombinants ont également été développés contre ce virus (Kydd et al., 2020; Paillot et al., 2008). Ils induisent des titres élevés d'anticorps neutralisants et protègent contre l'infection des voies respiratoires. De plus, ils réduisent la quantité et la durée de l'excrétion nasale du virus chez les animaux vaccinés. Les vaccins disponibles en Europe contre l’HVE-1 sont majoritairement à base de virus entier inactivé (Figure 11) et sont tous administrés par voie intramusculaire (Paillot and Pronost, 2014).

TABLEAU : VACCINS CONTRE LA RHINOPNEUMONIE DISPONIBLES					
VACCIN ⁽¹⁾	PRODUCTEUR	COMPOSITION	INDICATIONS	PLANNING DE VACCINATION	VOIE D'ADMINISTRATION
Equilis® Resequin	MSD Animal Health	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Vaccin à virus inactivé ✦ Souche HVE-1 (RAC-H) ✦ Souche HVE-4 (2252) ✦ Grippe équine 	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Rhinopneumonie ✦ Grippe équine 	<ul style="list-style-type: none"> ✦ V1-V2 : 6 semaines d'intervalle ✦ V3 : 2 à 6 mois plus tard ✦ Rappel : tous les 6 mois 	Intramusculaire
Equip® EHV-1,4 (anciennement Duvaxyn EHV-1/4)	Zoetis	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Vaccin à virus inactivé ✦ Souche HVE-1 ✦ Souche HVE-4 	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Rhinopneumonie ✦ Avortement infectieux (HVE-1) 	<ul style="list-style-type: none"> ✦ V1-V2 : 4 à 6 semaines d'intervalle ✦ Rappel : tous les 6 mois à 1 an 	Intramusculaire
Pneumequine® EHV-1	Merial	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Vaccin à virus inactivé ✦ Souche HVE-1 	Rhinopneumonie	<ul style="list-style-type: none"> ✦ V1-V2 : 1 mois plus tard ✦ V3 : 6 mois plus tard 	Intramusculaire
Prevaccinol®	MSD Tiergesundheit (Allemagne)	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Vaccin à virus vivant atténué ✦ Souche HVE-1 (RAC-H) 	Rhinopneumonie	<ul style="list-style-type: none"> ✦ V1-V2 : 3 à 4 mois d'intervalle ✦ Rappel : tous les 6 mois 	Intramusculaire

(1) Classés par ordre alphabétique.
V1, V2, V3 : primovaccinations.

Figure 11 : Liste des vaccins disponibles en Europe contre l’HVE-1. D’après Paillot et Pronost (2014).

Les deux vaccins actuellement commercialisés en France sont l’Equip HVE 1,4 (Zoetis) et le Pneumequine (Boehringer Ingelheim, anciennement Merial). Une étude expérimentale avec le « Duvaxyn HVE 1,4, » ancien nom de l’« Equip HVE 1,4 », a été publiée décrivant un effet sur les avortements. Des juments gravides, préalablement exposées à l’HVE-1, ont été

vaccinées à 5, 7 et 9 mois de gestation puis infectées 4 semaines plus tard avec la souche hautement pathogène Ab4. Une virémie cellulaire comparable à celle des juments contrôles a été observée chez toutes les juments vaccinées. Toutefois, l'incidence d'avortements provoqués par l'HVE-1 a été nettement réduite chez les juments vaccinées (1/5) par rapport aux juments non vaccinées (4/4) (Heldens et al., 2001). Sur l'ensemble des vaccins existants, aucune donnée n'est disponible concernant une réduction possible de la forme nerveuse induite par l'HVE-1. D'ailleurs, de nombreux cas de MHE ont été rapportés chez des chevaux vaccinés (Friday et al., 2000; Goodman et al., 2006; Henninger et al., 2007; Kohn and Fenner, 1987; Pusterla and Hussey, 2014). De plus, aucune donnée n'est disponible concernant l'efficacité des vaccins actuellement disponibles pour réduire ou prévenir l'apparition foyers à HVE-1. Par ailleurs, la vaccination contre l'HVE-1 n'est pas obligatoire en France pour tous les équidés. Seuls les étalons utilisés pour la monte et les chevaux de course doivent obligatoirement l'être. Il est cependant recommandé de vacciner l'ensemble des équidés afin de tendre vers une couverture vaccinale optimale sur le territoire.

5.2. Mesures de prise en charge

Malgré toutes ces mesures de prévention, de nombreux foyers infectieux à HVE-1 voient le jour chaque année. 57 cas d'avortements, 69 cas de MHE et 43 cas respiratoires provoqués par HVE-1 ont été rapportés à travers le monde en 2019 (<https://app.jshiny.com/jdata/icc/iccview>). Cependant, cette estimation est sous-évaluée car peu de pays rapportent leurs cas d'infections à HVE-1 et même dans ces pays, tous les cas ne sont pas déclarés. Les mesures de gestion face à un foyer infectieux à HVE-1 sont la gestion des cas cliniques, un diagnostic de confirmation en laboratoire et la prévention de la propagation (Lunn et al., 2009). Pour réaliser un diagnostic de confirmation, il est important de faire venir au plus vite son vétérinaire et qu'il connaisse les techniques de diagnostic les plus adaptées. En effet, une bonne connaissance des échantillons à réaliser, des techniques de prélèvement, des conditions de transport vers un laboratoire d'analyse compétent sont essentielles pour gérer au mieux l'épizootie (Goehring et al., 2010; Lunn et al., 2009; Pronost et al., 2012). Le vétérinaire doit également prendre des mesures barrières visant à ne pas disséminer le virus tant que la piste d'une infection virale n'a pas été écartée. Dans le cas d'un

foyer à HVE-1 confirmé, les mesures à prendre en compte ont été décrites en utilisant l'acronyme DISH (Allen et al., 2004) et consistent en I) Désinfection : « désinfecter la zone contaminée par les sécrétions ou les tissus », II) Isolement : « isoler les chevaux infectés et les chevaux ayant été en contact avec ces derniers », III) Dépôt : « transmettre les échantillons cliniques à un laboratoire de diagnostic compétent » et IV) Hygiène : « mettre en place des procédures d'hygiène afin de limiter la propagation de l'infection ». Par ailleurs, bien qu'il n'y ait pas de consensus, la vaccination peut être utilisée pendant l'épidémie chez des chevaux présentant un risque accru d'exposition (Allen et al., 2004; Lunn et al., 2009; Reed and Toribio, 2004).

La prise en charge des animaux atteints de MHE est lourde et consiste en l'aide au soutien par des sangles, à la nutrition, à l'évacuation de l'urine et des excréments, ainsi qu'en la réduction de l'inflammation (Lunn et al., 2009; Reed and Toribio, 2004). Le traitement symptomatique avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens semble avoir une efficacité (Goehring et al., 2017). L'utilisation de corticostéroïdes semble participer au contrôle ou à la prévention de la réponse cellulaire faisant suite à l'infection des cellules endothéliales du SNC, réduisant ainsi potentiellement les vascularites, thromboses et lésions neuronales qui en résultent (Pusterla and Hussey, 2014). Un traitement de courte durée avec des corticostéroïdes est fréquemment recommandé pour les animaux gravement atteints. Cependant, aucune donnée scientifique n'a encore démontré leur efficacité contre la MHE et leur justification demeure purement empirique. L'effet de plusieurs molécules antivirales comme l'aciclovir, le ganciclovir et le penciclovir a par ailleurs été étudié *in vitro* (Maxwell, 2017; Vissani et al., 2016). Mais seul l'efficacité d'un traitement au valgaciclovir, la pro-drogue de l'aciclovir, a été évalué lors de deux études expérimentales (Garré et al., 2009; Maxwell et al., 2017). Néanmoins, les résultats discordants obtenus entre ces études ne permettent pas de conclure sur une réelle efficacité de cette molécule. Cette partie, étant au cœur de mon sujet de thèse, est développée dans le chapitre 7 de cette introduction.

5.3. Tests diagnostics en laboratoire

L'HVE-1 est un agent pathogène très contagieux. L'utilisation de tests diagnostiques rapides pour sa détection est essentielle pour permettre d'orienter rapidement la gestion des

individus contaminés. Dans les laboratoires de virologie vétérinaire, le diagnostic d'une infection à HVE-1 se fait principalement par deux méthodes : 1/ par détection directe avec les techniques d'isolement viral sur culture cellulaire et/ou par PCR, et 2/ par détection indirecte avec la recherche d'anticorps neutralisants en utilisant des tests immunologiques.

5.3.1. Diagnostic par culture cellulaire

L'isolement viral sur lignée cellulaire est la méthode de référence pour détecter la présence d'HVE-1 dans un échantillon (Lunn et al., 2009; OIE, 2018). L'isolement viral se fait principalement à partir d'écouvillons naso-pharyngés, d'échantillons de sang non-coagulés, de tissus prélevés sur des fœtus (foie, poumon, rate, etc...) ou de prélèvements biologiques issus du système nerveux central (Balasuriya et al., 2015). Pour optimiser les chances de réussite en culture, les échantillons doivent être transportés préférentiellement à 4°C et traités dans les 24 heures. Sinon il est conseillé de les stocker à -80°C, sauf pour les échantillons sanguins qui ne peuvent être congelés. L'isolement de l'HVE-1 peut être réalisé sur des lignées cellulaires d'origines diverses telles que des cellules ED, des cellules pulmonaires d'embryon équin (EEL), des cellules rénales d'embryon équin (EEK), des cellules rénales bovine Madin-Darby (MDBK) ou encore des cellules rénales de lapin (RK13) (Balasuriya et al., 2015). La morphologie du tapis cellulaire est observée après 5 à 7 jours de culture. L'apparition d'effets cytopathiques (ECP) indique la présence de particules virales infectieuses dans l'échantillon inoculé. Les ECP provoqués par l'HVE-1 sont généralement caractérisés par un élargissement, un arrondissement, un regroupement et un détachement des cellules (Figure 12). Cette méthode présente plusieurs avantages : elle permet de mettre en évidence la présence du virus infectieux et l'isolement de la souche permet d'envisager des études pour caractériser le virus ou étudier l'effet de molécules antivirales par exemple.

5.3.2. Diagnostic par PCR

Le diagnostic par PCR, plus rapide, est aujourd'hui utilisé dans pratiquement tous les laboratoires pour mettre en évidence la présence de l'HVE-1 en quelques heures. Le principal avantage des techniques PCR réside dans leur grande sensibilité, donc leur capacité de détecter un faible nombre de pathogènes, et leur spécificité liée au principe même du test. Les processus d'extraction d'ADN et de quantification sont très rapides et permettent d'obtenir les résultats généralement en moins de 4 heures. Cependant, les techniques de PCR ne permettent pas d'affirmer que le virus détecté est infectieux. Concernant l'HVE-1, la

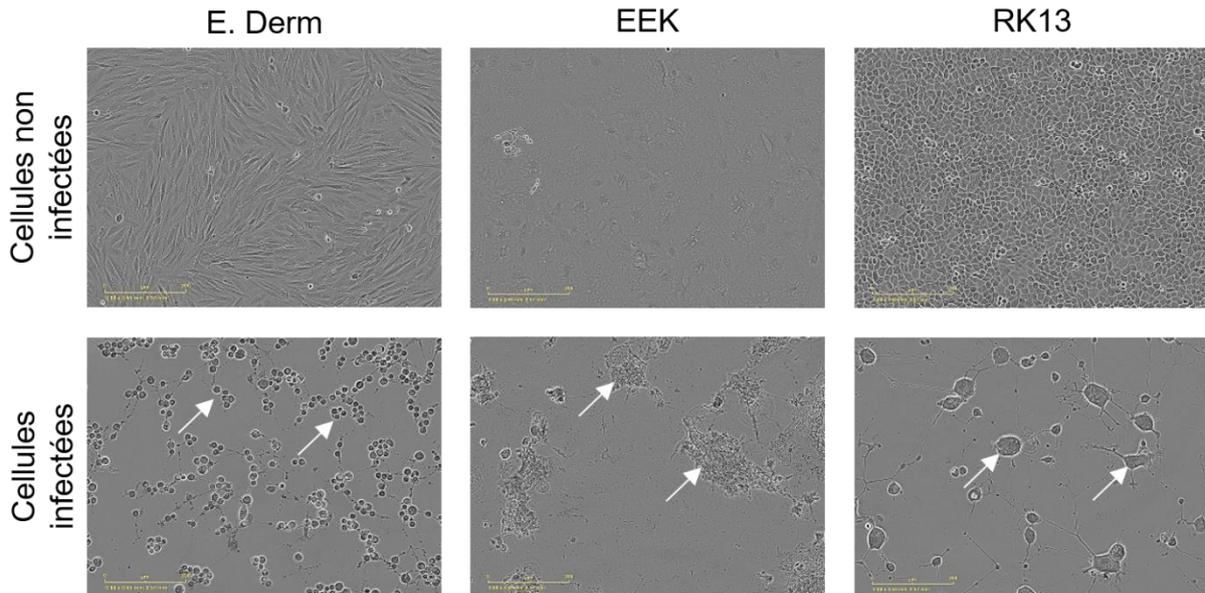


Figure 12 : Observation au microscope optique ($\times 10$) de lignées cellulaires infectées ou non par l'HVE-1. Les lignées cellulaires présentées correspondent aux cellules équine dermique (E. Derm ou ED), aux cellules rénales d'embryon équin (EEK) et aux cellules rénales de lapin (RK13). Les flèches blanches indiquent les effets cytopathiques (ECP) induits par l'HVE-1.

majorité des tests de dépistage ciblent des régions bien conservées telles que les gènes codant la gB (Diallo et al., 2006; Pusterla et al., 2009), la gC (Carvalho et al., 2000), l'ADN polymérase (Lechmann et al., 2019; Pusterla et al., 2009) et la thymidine kinase (Kibenge et al., 1994). Si la grande majorité des tests de diagnostic sont non quantitatifs, il est également possible de quantifier précisément le nombre de copies d'ADN viral présent dans l'échantillon en utilisant des tests de PCR quantitative (qPCR). Dans le domaine vétérinaire, des normes ont été rédigées pour le développement de ces tests quantitatifs visant à harmoniser les tests entre les laboratoires (Ref U47600-1 et -2). Le SyberGreen (intercalant de l'ADN) (Figure 13A) et les sondes Taqman (Figure 13B) sont les technologies les plus utilisées afin de détecter les produits PCR.

Cette technologie de diagnostic s'est bien développée au sein des laboratoires dans le monde entier ces vingt dernières années et des méthodes rapides dites « point of care » ont fait leur apparition depuis quelques années dans le domaine vétérinaire (Balasuriya et al., 2015).

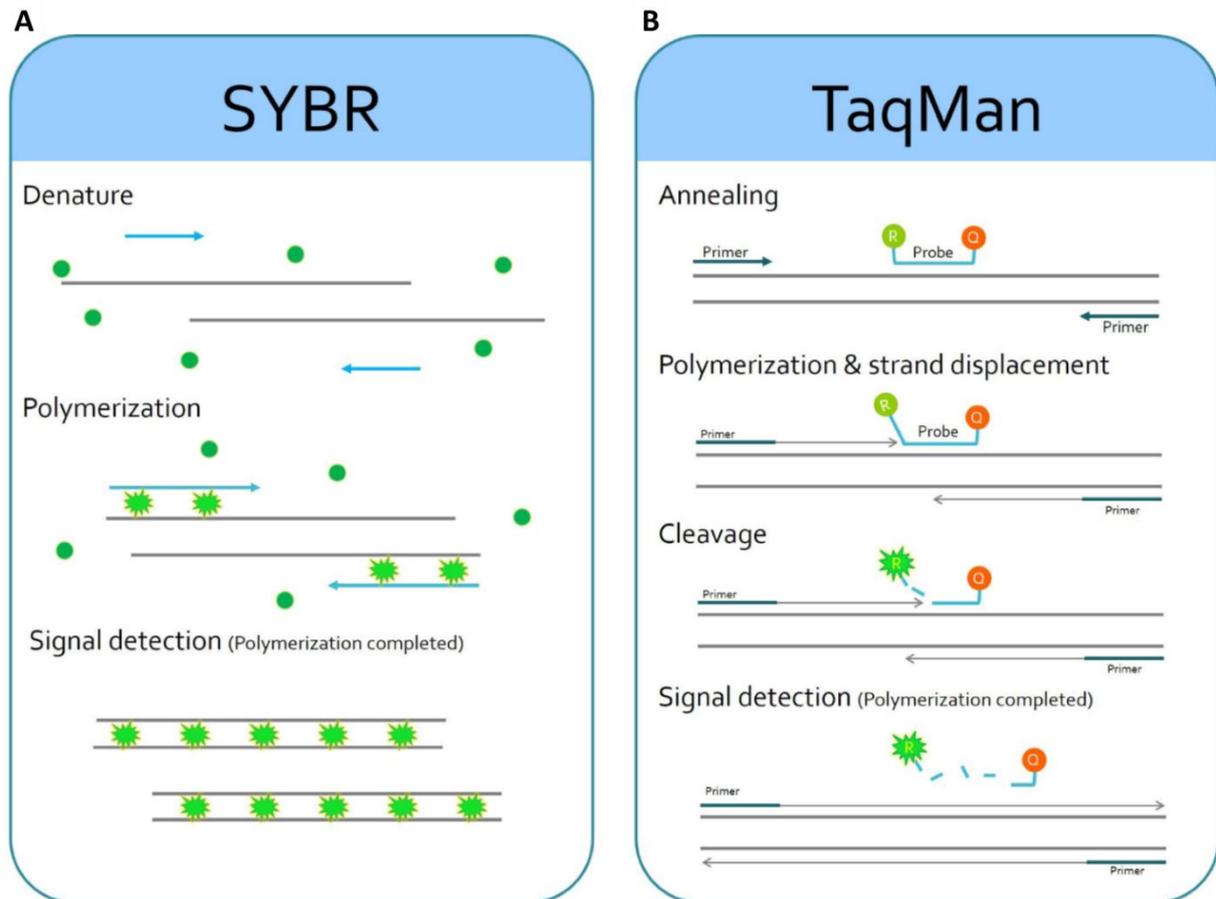


Figure 13 : Principes de détection du signal PCR en temps réel. (A) Les agents se lient à l'ADN, comme le Sybergreen (SYBR), libèrent une fluorescence non spécifique lorsqu'ils sont intercalés à l'ADN. (B) L'activité exonucléase de la Taq polymérase clive les sondes Taqman permettant l'émission d'une fluorescence spécifique.

5.3.3. Tests immunologiques

La réponse immunitaire innée correspond à la première ligne de défense de l'organisme. Elle permet de limiter la diffusion du virus au cours des premières heures qui suivent l'infection. Elle est immédiate et intervient localement. Elle n'est cependant pas spécifique. La réponse immunitaire adaptative ou spécifique, apparaît après la réponse immunitaire innée. Elle est spécifique du pathogène et induit une réponse mémoire persistante. La réponse adaptative est divisée entre la réponse des anticorps humoraux et la réponse à médiation cellulaire, impliquant respectivement les lymphocytes B et T.

Les tests immunologiques de diagnostic permettent de démontrer indirectement l'exposition d'un cheval à l'HVE-1. En effet, on observe généralement une séroconversion chez les chevaux infectés qui voient leur quantité d'anticorps sériques spécifiques augmenter

entre deux analyses réalisées à 3 semaines d'intervalles (Kydd et al., 2006). Les trois principaux tests sérologiques utilisés pour détecter la présence d'anticorps anti-HVE-1 sont, le test de séro-neutralisation (SN), la réaction de fixation du complément (RFC) et la technique ELISA. Le test de SN permet de détecter la présence d'anticorps tardifs et présente l'avantage d'être semi-quantitatif. Cependant le test de SN repose sur le principe de la culture cellulaire et l'obtention des résultats nécessite plusieurs jours. Concernant la RFC, les anticorps fixant le complément sont produits rapidement après infection (4 à 5 jours) mais ne sont détectés que sur une courte période (Balasuriya et al., 2015). La RFC permet donc de détecter la présence d'anticorps précoces et les résultats sont obtenus rapidement. Cependant cette méthode n'est pas spécifique car elle ne permet pas de faire la différence entre anticorps anti-HVE-1 et anti-HVE-4. La technologie ELISA présente l'avantage d'être très modulable. De nombreux tests ont d'ailleurs été développés contre l'HVE-1 (Hartley et al., 2005; Lang et al., 2013; Singh et al., 2004) Tout comme la RFC, elle est facile à mettre en place et les résultats sont obtenus rapidement. De plus cette technique est utilisée en format 96 puits, permettant de faire des tests à grande échelle. L'utilisation de gammes permet de rendre cette technique quantitative. Un test ELISA utilisant la partie C-terminale des gG a été développé et permet de faire la distinction entre les anticorps dirigés contre l'HVE-1 et l'HVE-4 (Crabb et al., 1995).

6. Antiviraux anti-herpétiques

Un traitement antiviral idéal vise, cible et inhibe le plus spécifiquement possible un événement de la réplication virale, sans influencer le métabolisme de la cellule hôte. L'attachement du virus, l'entrée, la décapsidation, la synthèse protéique, la réplication de l'ADN, l'assemblage, et le bourgeonnement sont les étapes clés de la réplication des herpèsvirus (partie 2) et sont donc autant de cibles potentielles pour des molécules antivirales. Cependant l'utilisation à long terme de molécules antivirales contre les herpèsvirus humains conduit à l'émergence de souches résistantes et pose de réels problèmes, majoritairement chez les patients immunodéprimés. C'est pourquoi le développement et/ou le repositionnement de nouvelles molécules, avec des modes d'actions qui diffèrent de ceux des molécules existantes est devenu un enjeu majeur depuis maintenant plus de dix ans. La récente pandémie de COVID19 a montré que l'homme était vraiment démuni face à ces virus émergents.

6.1. Molécules antivirales utilisées contre des herpèsvirus humains

Le docteur Gertrude B. Elion a reçu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1988 suite à la mise au point de l'aciclovir pour traiter les infections à HSVs et VZV (Goodwin, 1989). Depuis, les traitements par des antiviraux contre les herpèsvirus humains sont limités principalement aux inhibiteurs de l'ADN polymérase virale avec notamment l'utilisation d'analogues de nucléosides et de nucléotides. Cependant, d'autres composés plus originaux ont été développés ou sont en cours de développement contre l'ensemble de ces virus.

6.1.1. Analogues de nucléosides

a) Analogues d'uridine : idoxuridine, trifluridine et brivudine

Les trois molécules de cette famille utilisées dans la lutte contre les infections à herpèsvirus sont l'idoxuridine, la trifluridine et la brivudine (Figure 14).

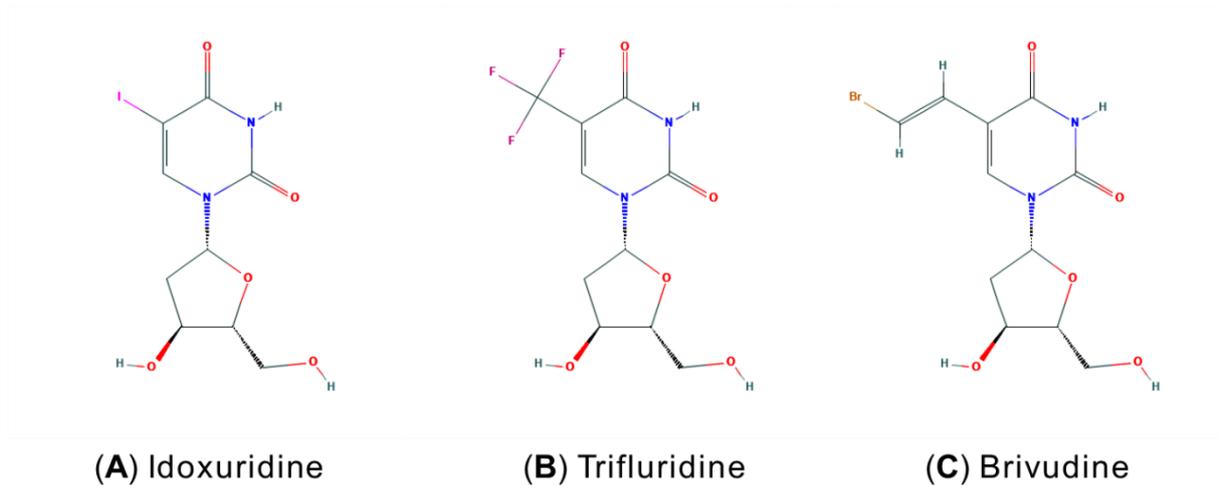


Figure 14 : Analogues d'uridine utilisés contre des herpèsvirus humains. Structure de l'idoxuridine (A), de la trifluridine (B) et de la brivudine (C).

L'ère des antiviraux a vu le jour en 1959 avec la découverte et la description de l'idoxuridine (IDU ou 5-iodo-2'-déoxyuridine) (Prusoff, 1959). Cette molécule a d'abord été décrite dans un projet de recherche de molécules anti-tumorales (Prusoff, 1960). En 1961, cette molécule a été utilisée pour la première fois *in vitro* en tant que molécule antivirale contre l'HSV-1 et le virus de la variole (Herrmann, 1961). Son efficacité fut ensuite vite démontrée *in vivo* contre la kératite herpétique chez le lapin et chez l'homme (Kaufman et al., 1962; Kaufman, 1962). La trifluridine (TRF ou 5-trifluorométhyle-2'-déoxythymidine) a été découverte et décrite en 1964 comme étant efficace contre des infections à HSV (Heidelberger et al., 1964; Kaufman and Heidelberger, 1964). Cependant, l'IDU et la TRF nécessitent d'être phosphorylées par des kinases cellulaires afin d'être actives. La TRF est active sous sa forme monophosphate (TRF-MP) tandis que l'IDU est active sous sa forme triphosphate (IDU-TP) (Clercq, 1997). Sous leur forme active respective, ces deux molécules entrent en compétition avec la thymidine triphosphate pour s'intégrer dans l'ADN viral du brin en cours de synthèse. Ce processus entraîne des erreurs de codage, inhibant ainsi l'ADN polymérase du virus et donc sa réplication. L'IDU et la TRF ne sont pas considérées comme des molécules antivirales spécifiques car elles ne nécessitent pas la présence de virus pour être actives. En effet toutes les étapes de phosphorylation sont réalisées par des kinases cellulaires. Ces erreurs de codage ont également lieu au sein de l'ADN des cellules non infectées, ce qui rend ces molécules fortement toxiques et limite leur utilisation. Néanmoins,

ces deux molécules sont encore, à ce jour, utilisées en Europe pour le traitement de kératites induites par HSVs (Pastuch-Gawotek et al., 2019; Wilhelmus, 2010).

La brivudine (BVDU ou (*E*)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine) a été découverte plus récemment (De Clercq et al., 1979). Cette molécule a été décrite comme étant plus efficace que l'IDU, la TRF et l'aciclovir (ACV) *in vitro* contre l'HSV-1 et le VZV (Maudgal and Clercq, 1991). Le mécanisme d'action de la BVDU est dépendant de phosphorylations spécifiques réalisées par les thymidines kinases (TK) de ces virus. En effet ces TK virales convertissent la BVDU en 5'-monophosphate (BVDU-MP) puis en 5'-diphosphate (BVDU-DP) (Descamps et al., 1981). Il survient ensuite une troisième phosphorylation réalisée par une nucléoside diphosphate kinase (NDK) cellulaire, convertissant la BVDU-DP en 5'-triphosphate (BVDU-TP). Sous cette forme, la BVDU stoppe la réplication virale en interagissant avec l'ADN polymérase virale de deux façons : 1) par compétition avec la désoxythymidine triphosphate (dTTP), 2) comme substrat alternatif, permettant son incorporation dans l'ADN viral en cours de synthèse (Allaudeen et al., 1981). Les thymidine kinases de l'HSV-1 et du VZV peuvent réaliser les deux premières étapes de phosphorylation, rendant cette molécule active contre ces virus (De Clercq, 2004). Cependant, la thymidine kinase de l'HSV-2, n'est pas capable de phosphoryler la BVDU en BVDU-MP et BVDM-DP (Ayisi et al., 1984; Fyfe, 1982), ce qui la rend inefficace contre ce dernier. Contrairement à l'IDU et la TRF, la BVDU ne présente pas de toxicité. Cette molécule est encore administrée en Europe pour le traitement d'infections à HSV-1 et VZV et semble être la molécule de premier choix à utiliser contre les cas sévères d'infections à VZV (Yaldiz et al., 2016). De plus, la brivudine semble efficace contre les encéphalites induites par le virus d'Epstein Barr (EBV). Cependant, des essais cliniques complémentaires sont encore nécessaires pour confirmer cette application (Lahmer et al., 2010; Pastuch-Gawotek et al., 2019).

b) Analogues de guanosine : (val)aciclovir, (val)ganciclovir, penciclovir et famciclovir

Il existe actuellement six analogues acycliques de guanosine pour combattre les infections provoquées par les herpèsvirus. Il s'agit de l'aciclovir (ACV), du ganciclovir (GCV) du penciclovir (PCV) et de leurs pro-drogues respectives, le valaciclovir (VACV), le valganciclovir (VGCV) et le famciclovir (FCV) (Figure 15).

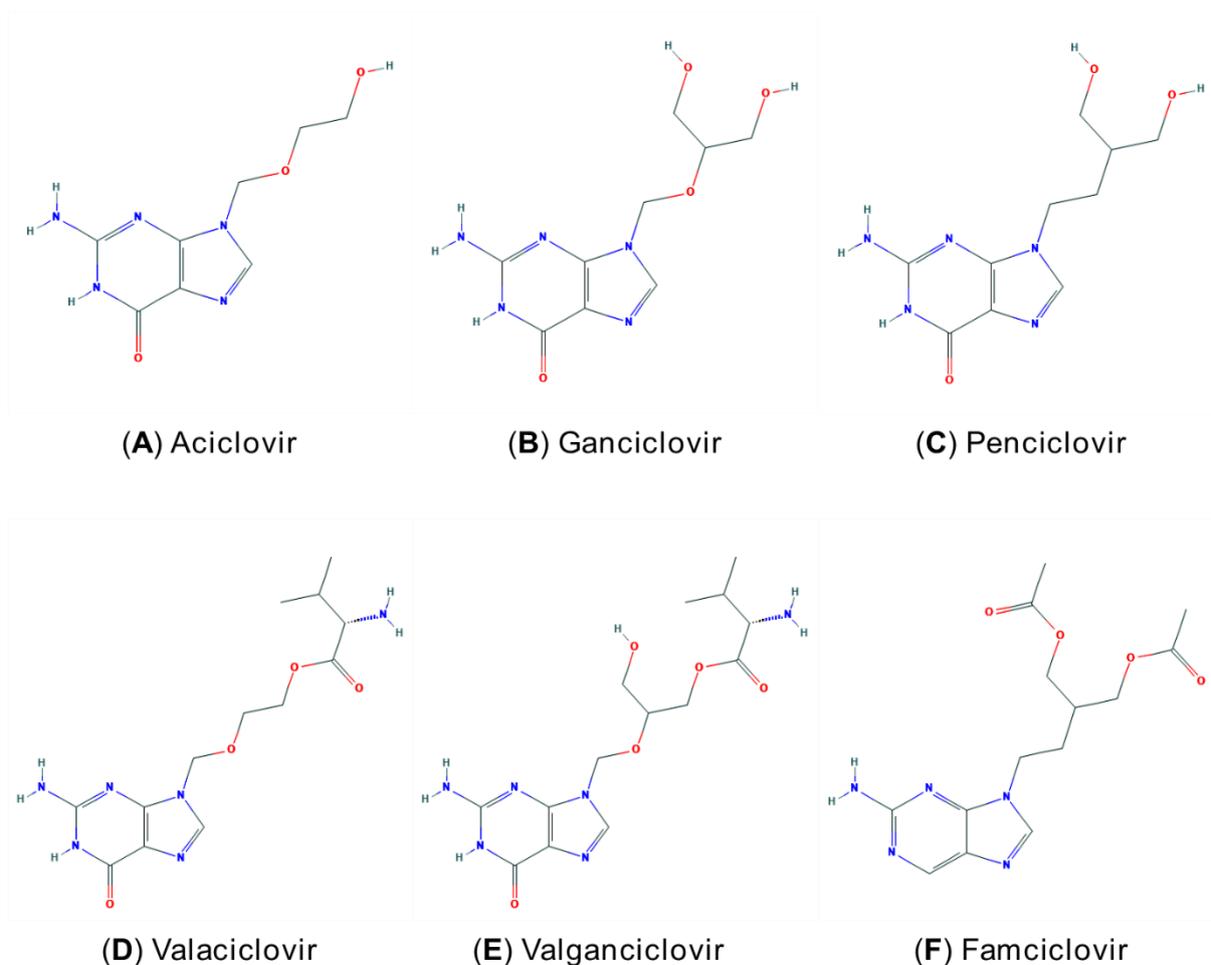


Figure 15 : Analogues de guanosine utilisés contre des herpèsvirus humains. Structure de l'aciclovir (A), du ganciclovir (B) du penciclovir (C) et de leurs prodrogues respectives : valaciclovir (D), valganciclovir (E) et famciclovir (F).

Le traitement des infection à herpèsvirus a connu son essor au début des années 1980 avec la découverte de l'aciclovir (ACV ou [9-(2-hydroxyethoxy)methyl]guanine]). Cette molécule a tout d'abord été décrite en 1974 dans le carnet de laboratoire de Nick Oliver (De Clercq, 2008; De Clercq and Field, 2006). La découverte de l'ACV est le résultat d'un projet de

développement de médicaments qui visait à développer des inhibiteurs de l'adénosine désaminase pour renforcer l'activité antivirale de la vidarabine (VIR) (De Clercq, 2008). L'activité antivirale *in vitro* de l'ACV contre les HSVs a été démontrée par Elion et al. (1977) et Schaeffer et al. (1978). Cette activité est due à une phosphorylation par les TK de HSV-1 et HSV-2. Le ganciclovir (GCV ou 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl)]guanine) fut ensuite découvert en 1982 par Smith et al. et décrit comme étant très efficace contre les HSV-1 et HSV-2. Cependant, il s'est montré moins efficace contre le VZV et EBV (Smith et al., 1982). L'effet anti-herpétique du penciclovir (PCV ou 9-[4-hydroxy-3-(hydroxyméthyl)butyl]guanine) a été décrit *in vitro* en 1987 par Boyd et al. (1987) et présente une activité comparable à celle de l'ACV contre l'HSV-1, l'HSV-2 et le VZV. Ce composé a ensuite montré une bonne efficacité *in vivo* sur les modèles souris et cochons d'Inde infectés par les HSV-1 et HSV-2 (Boyd et al., 1988).

Ces trois composés doivent être sous leur forme triphosphorylée pour être actifs. Dans les cellules infectées, la première étape de phosphorylation est majoritairement réalisée par une kinase virale, ce qui détermine la spécificité de ces molécules contre les herpesvirus. La conversion de ces molécules sous leur forme di- et triphosphate est ensuite réalisée par des kinases cellulaires. Sous leur forme triphosphate, ces composés entrent en compétition avec la 2'-déoxyguanosine triphosphate en tant que substrat pour l'ADN polymérase virale (figure 16). Leur insertion dans l'ADN en cours de réplication provoque l'arrêt de l'élongation et stoppe la multiplication du virus. Par ailleurs, il a été démontré que l'ACV-TP inhibait 30 à 50 fois plus l'ADN polymérase virale que l'ADN polymérase cellulaire de type α (St Clair et al., 1984), expliquant la faible toxicité de ce composé.

L'ACV et le GCV présentent une faible biodisponibilité lorsqu'ils sont administrés par voie orale, ce qui a conduit au développement de leurs pro-drogues respectives : le valaciclovir (VACV) et le valganciclovir (VGCV). Après ingestion, ces pro-drogues sont rapidement converties en ACV et GCV par des hydrolases présentes dans le tractus gastro-intestinal et dans le foie (Figure 16) (Soul-Lawton et al., 1995). La biodisponibilité de l'ACV est de 54% chez l'homme après administration par voie orale de VACV. Elle se trouve augmentée de trois à cinq fois par rapport à une administration orale d'ACV (Soul-Lawton et al., 1995). La biodisponibilité du GCV est d'environ 60% après administration par voie orale de VGCV chez l'homme et se trouve donc multipliée par 10 par rapport à l'administration orale de GCV

(Curran and Noble, 2001; Czock et al., 2002; Jung and Dorr, 1999). La forte biodisponibilité du GCV après administration orale de VGCV est due à la forte affinité entre le VGCV et le transporteur de peptides intestinal PEPT1 (Figure 17) (Sugawara et al., 2000). Le famciclovir (FCV) est quant à lui l'analogue diacétyl-6-déoxy du PCV. La biodisponibilité du PCV après administration orale de FCV est estimée à 77 % chez l'homme (Gill and Wood, 1996).

L'ACV, le PCV et leurs pro-drogues respectives, VACV et FCV sont les molécules antivirales de première ligne contre les HSVs et le VZV (Piret et al., 2016). Le GCV et le VGCV sont quant à eux les antiviraux de première ligne pour traiter les infections au CMV (Razonable, 2018).

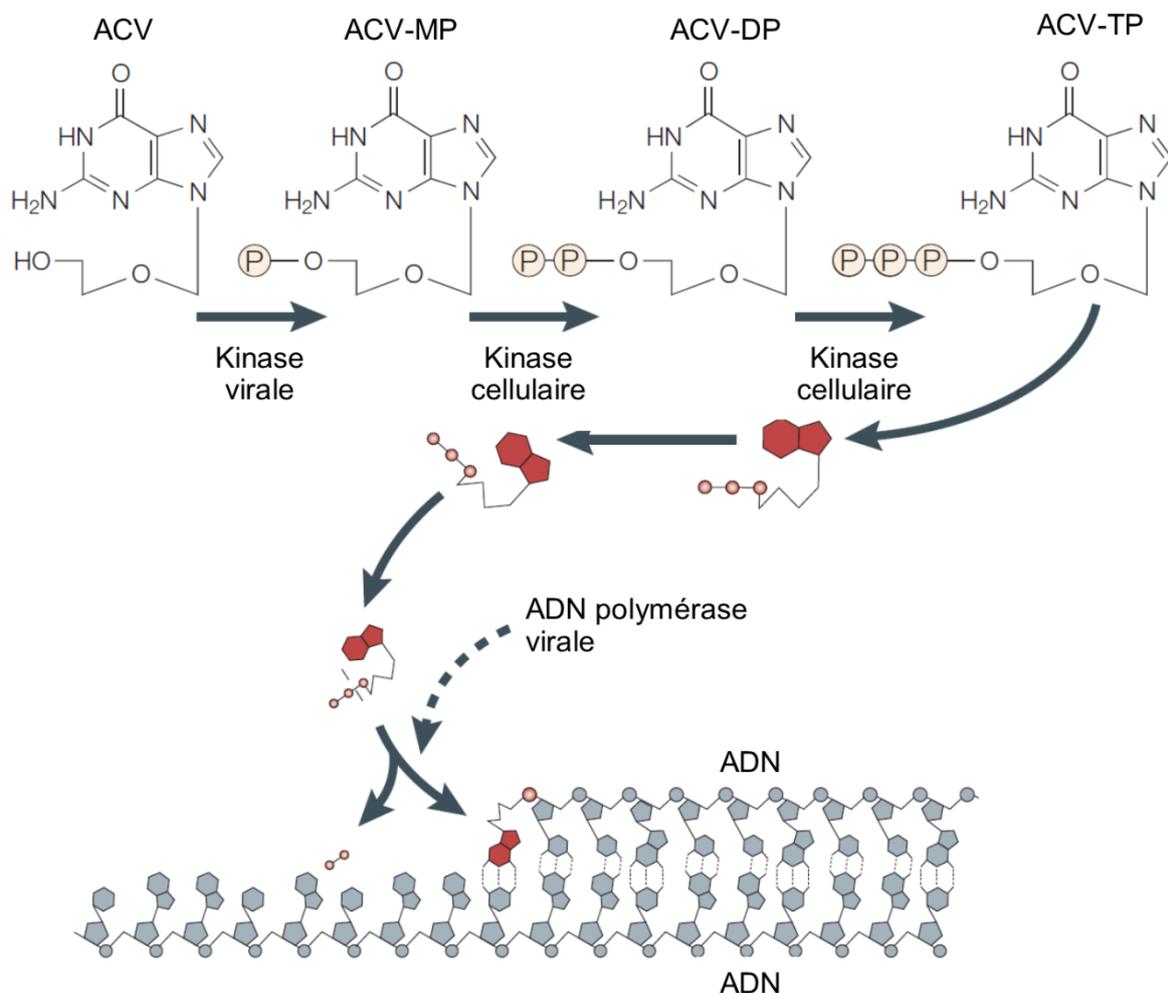


Figure 16 : Mode d'action de l'aciclovir (modèle d'analogue de guanosine) pour inhiber la synthèse d'ADN viral. L'aciclovir cible l'ADN polymérase virale de nombreux herpesvirus, tels que les HSV-1, HSV-2 et VZV. Avant de pouvoir s'intégrer dans l'ADN viral en cours de synthèse, l'aciclovir doit subir trois étapes de phosphorylation intracellulaire. La première étape est réalisée par la thymidine kinase (TK) virale, la seconde et la troisième phosphorylation sont assurées par des kinases cellulaires (le mode d'action est similaire pour le ganciclovir et le penciclovir). Schéma adapté d'après De Clercq et al., 2002.

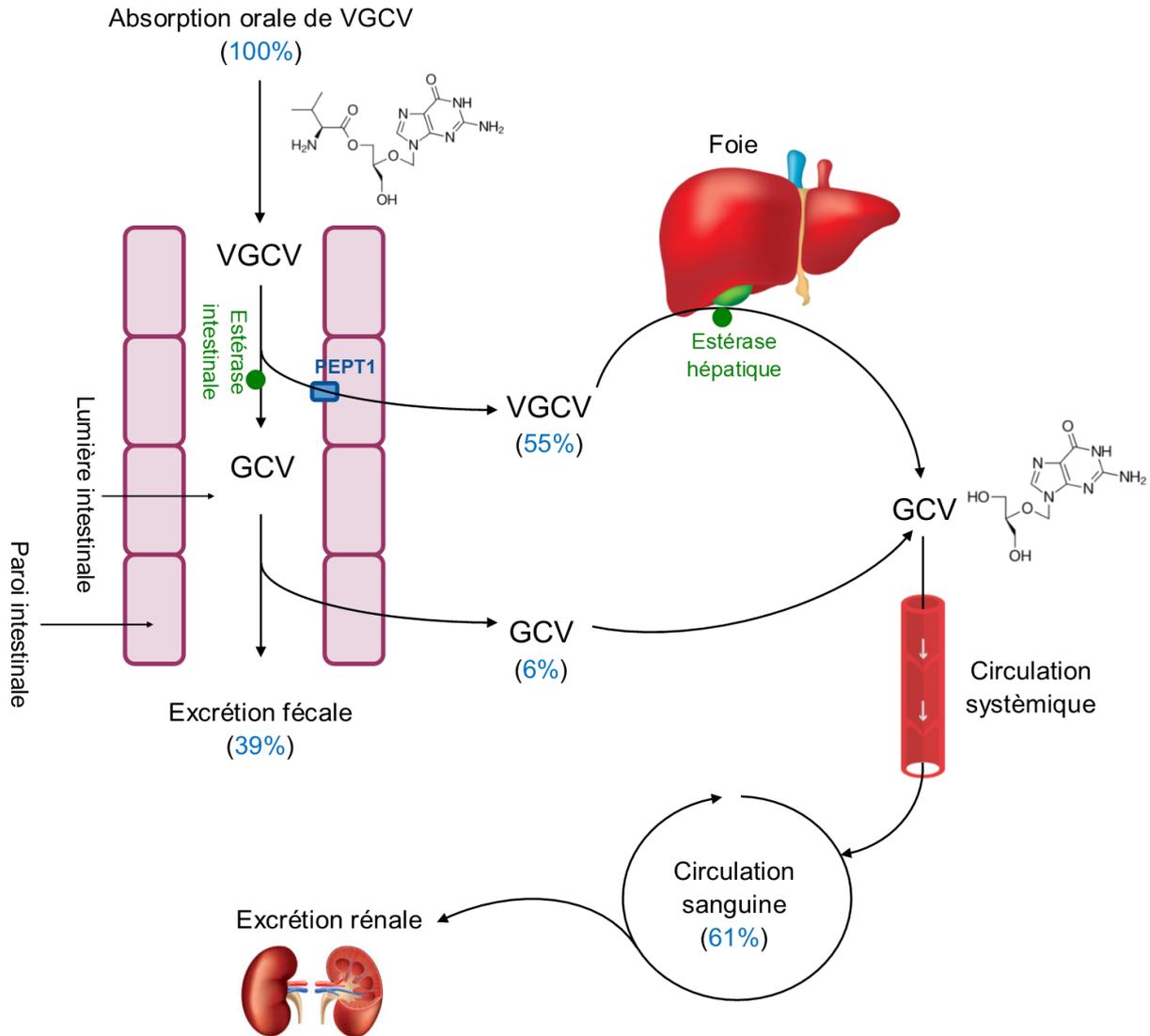


Figure 17 : Métabolisation et devenir du ganciclovir (GCV) après absorption orale de valganciclovir (VGCV). Le valganciclovir est hydrolysé en ganciclovir par les estérases présentes dans le tractus gastro-intestinal et dans le foie. Le VGCV passe la paroi intestinale grâce au transporteur de peptides intestinal PEPT1. Le GCV passe dans la circulation sanguine pour être distribué dans tout l'organisme. Il est principalement éliminé par la voie urinaire.

c) Analogues d'adénosine : vidarabine, entecavir et lamivudine

Trois analogues d'adénosine sont actuellement utilisés comme molécules antivirales en médecine humaine : La vidarabine (VIR), l'entecavir et la lamivudine (figure 18).

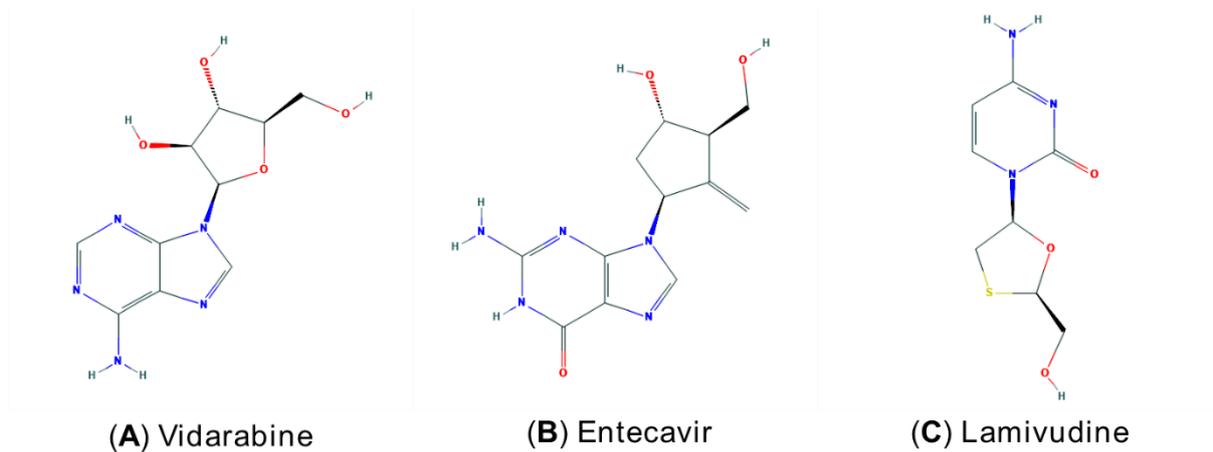


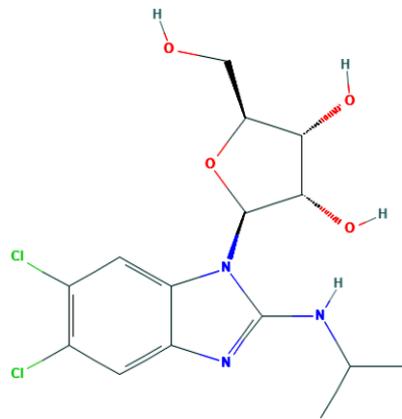
Figure 18 : Analogues de nucléosides utilisés comme molécules antivirales en médecine humaine. Structure de la vidarabine (A), de l'entecavir (B) et de la lamivudine (C).

En 1950, Bergmann et al. (1950) ont isolé les nucléosides spongothymidine et spongouridine de l'éponge *Tethya crypta* (Tethylidae) présente dans la mer des Caraïbes. Ces composés ont la particularité de posséder un sucre arabinose plutôt qu'un ribose, classiquement trouvé dans les nucléosides. La vidarabine (VIR, Ara-A ou 9-β-D-arabinofuranosyladenine) (Figure 18A) est un analogue synthétique de la spongouridine qui a tout d'abord été décrite comme molécule anticancéreuse (Cohen, 1966; Lee et al., 1960). En 1965, de Rudder and Privat de Garilhe (1965) ont rapporté une activité antivirale de la VIR contre l'HSV-1 et le virus de la vaccine *in vitro*. La VIR a ensuite été décrite comme étant efficace contre un large spectre de virus à ADN (Schabel, 1968, Sidwell et al., 1972). Les travaux du docteur Whitley ont permis de prouver l'efficacité de cette molécule pour réduire les infections à VZV avec un traitement précoce chez les patients immunodéprimés, pour traiter l'encéphalite herpétique et d'autres infections herpétiques survenant chez les nouveaux nés (Whitley et al., 1976). La VIR, comme la majorité des antiviraux précédemment décrits, doit subir trois étapes de phosphorylation pour être activée et inhiber l'ADN polymérase virale (Field and Clercq, 2004; Sagar et al., 2010). Cette molécule fut le premier analogue de nucléoside à être utilisé en clinique pour traiter des infections herpétiques. Elle est toutefois facilement métabolisée par l'adénosine désaminase en arabinofuranosyl hypoxanthine (ara-H), qui possède une activité antivirale 10 fois moins importante que le VIR (Shope et al., 1983; Sloan et al., 1977). Par ailleurs, la VIR est peu soluble en solution aqueuse et présente une faible absorption intramusculaire. Pour une administration intraveineuse, cela nécessite de grands volumes, entraînant des perfusions pouvant durer jusqu'à 12 heures

(Whitley et al., 1980). Face à ces limitations et à la découverte de l'ACV, qui s'est montré plus efficace, l'utilisation clinique de la VIR a peu à peu régressé (Shepp et al., 1986; Whitley et al., 1992). L'entecavir et la lamivudine (Figure 18B, 18C) sont quant à elles utilisées pour traiter des infections provoquées par le virus de l'hépatite B et ne seront donc pas détaillés dans ce manuscrit (Chang et al., 2006; De Clercq and Li, 2016).

d) Autre nucléoside : maribavir

Le maribavir, anciennement appelé 1263W94, est un benzimidazole L-riboside décrit pour la première fois en 1996 (Migawa et al., 1998) (Figure 19).



Maribavir

Figure 19 : Structure du maribavir.

Ce composé présente une très bonne activité contre l'EBV et le CMV mais aucune contre les HSV-1, HSV-2 et VZV (Williams et al., 2003). Contrairement aux agents anti-CMV disponibles, le maribavir bloque la sortie nucléaire des capsides virales en inhibant la protéine kinase UL97 (Biron et al., 2002; Hamirally et al., 2009; Krosky et al., 2003). *In vitro*, le maribavir possède une activité supérieure au GCV, au foscarnet et au CDV. Par ailleurs il est actif contre des souches résistantes à ces dernières (Drew, 2006). De plus, le maribavir n'a pas besoin d'étape de phosphorylation intracellulaire pour être actif. Il a été néanmoins démontré que le maribavir a un effet antagoniste sur l'activité antivirale du GCV (Chou and Marousek, 2006; James et al., 2011). D'autre part, des essais cliniques ont permis de montrer qu'une dose de 100 mg de maribavir deux fois par jour, ne permettait pas de prévenir des infections à CMV (Marty and Boeckh, 2011; Winston et al., 2012). Néanmoins, une dose

minimum de 400 mg de maribavir deux fois par jour, a montré une efficacité similaire à celle du VGCV pour supprimer la virémie du CMV chez des receveurs de greffes de cellules hématopoïétiques ou d'organes (Maertens et al., 2019). Par ailleurs, d'autres essais cliniques ont permis de démontrer que le maribavir n'est pas myélosuppresseur ni néphrotoxique mais il peut entraîner des problèmes gastro-intestinaux (Maertens et al., 2019; Wang et al., 2003; Winston et al., 2008). Les résultats très prometteurs obtenus avec le maribavir ont permis de montrer que la kinase UL97 est une bonne cible pour la thérapie antivirale.

6.1.2. Analogues de nucléotides

a) Adéfovir, cidofovir et ténofovir

La première molécule découverte appartenant à ce groupe fût la HPMPA (9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine). Cette molécule a été décrite en 1986 comme présentant un effet antiviral à large spectre contre les virus à ADN (De Clercq et al., 1986). Elle n'a cependant jamais été commercialisée pour des usages cliniques mais a servi de prototype pour le développement de l'adéfovir (PMEA ; 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine), du cidofovir (CDV ou HPMPIC ; ((S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)-cytosine)) et du ténofovir (PMPA ; 9-(2-phosphonomethoxypropyl(adenine)) (De Clercq, 2013, 2009; De Clercq and Holý, 2005) (Figure 20A, 20B, 20C). Ces trois composés ont montré une bonne efficacité *in vitro* contre l'HSV-1, l'HSV-2, le VZV, le CMV et l'adénovirus (De Clercq et al., 1986). Contrairement aux analogues acycliques de guanosine, ces molécules possèdent déjà un groupement phosphate.

La première étape de phosphorylation réalisée par des kinases virales n'est donc pas nécessaire pour ces 3 analogues. Ces molécules n'ont besoin que d'une seule étape de phosphorylation, réalisée par une kinase cellulaire, pour être convertie sous leur forme active (di-phosphate) (De Clercq, 2002). L'adéfovir-DP et le ténofovir-DP, agissent comme terminateurs de la reverse transcriptase virale. L'introduction d'une seule molécule de ces composés dans l'ADN viral est suffisante pour stopper sa synthèse (Balzarini and De Clercq, 1991; De Clercq, 2002).

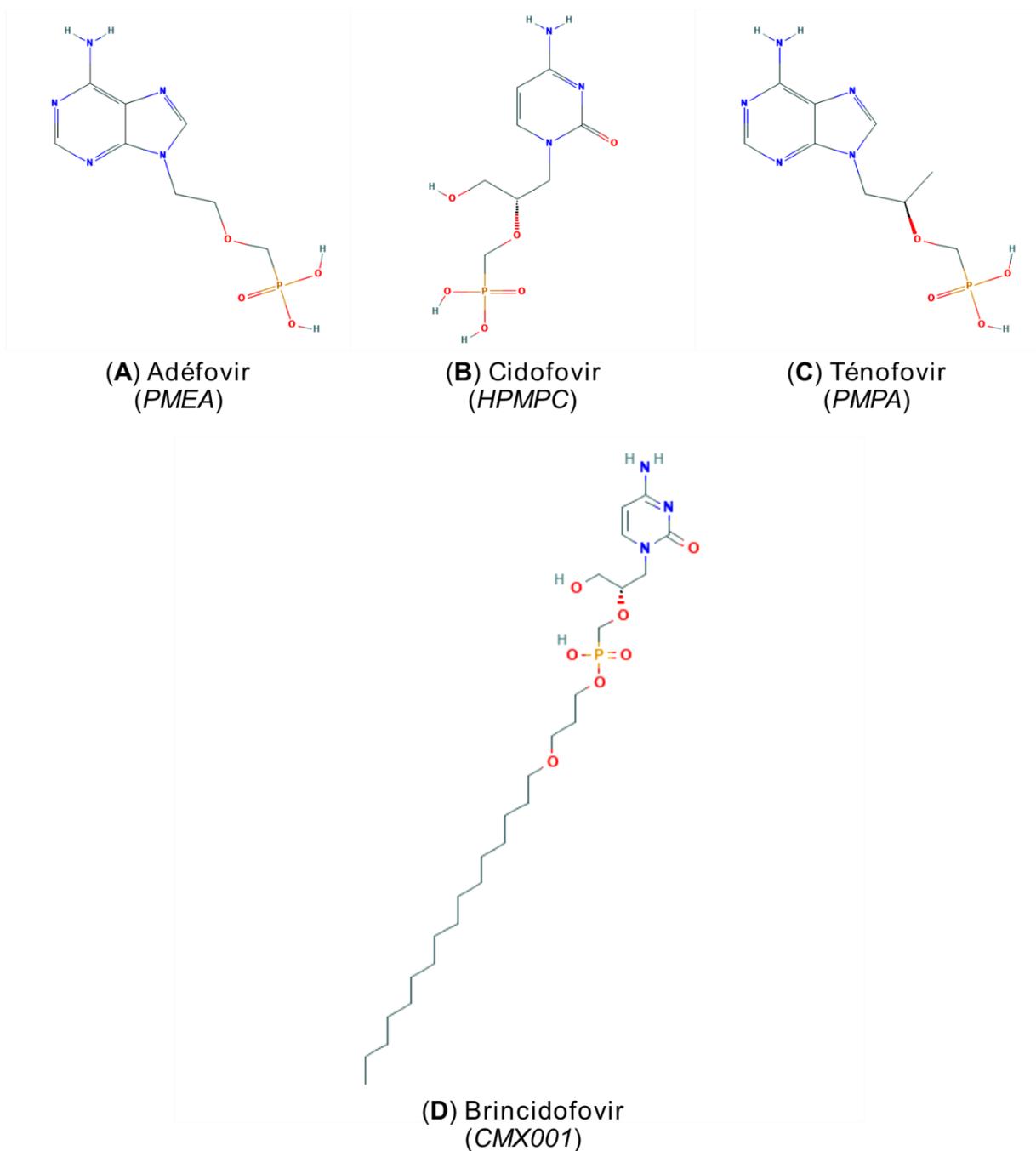


Figure 20 : Analogues de nucléotides utilisés comme antiviraux. Structure de l'adéfovir (A), du cidofovir (B), du ténofovir (C) et du brincidofovir (D).

L'adéfovir et le ténofovir ont été commercialisés sous leur forme pro-drogues, adéfovir dipivoxil (Hepsera®) et ténofovir disoproxil (Viread®) pour traiter des infections au virus de l'hépatite B et au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Balzarini and De Clercq, 1991; De Clercq, 2002). Le CDV-DP, quant à lui, entre en compétition avec la désoxycytosine-5-triphosphate comme substrat de l'ADN polymérase et stoppe l'action de l'ADN polymérase

virale. Contrairement aux molécules précédentes, deux incorporations de CDV-DP successives sont nécessaires pour stopper la synthèse de l'ADN polymérase virale (De Clercq, 2002; Xiong et al., 1997). L'administration de CDV se fait par voie intraveineuse. Cette molécule est transportée activement dans les cellules épithéliales du rein par le transporteur d'anions organiques humains 1 (OAT1) mais présente une forte néphrotoxicité chez les animaux et également chez l'homme (Cihlar et al., 2001, 1999; Ho et al., 2000). Afin de limiter cet effet, la pré-hydratation du patient avec une solution saline et la co-administration de probénécide, un inhibiteur des transporteurs d'anions organiques sont recommandées (Lacy et al., 1998; Polis et al., 1995). Malgré ces mesures de prévention, l'utilisation clinique du CDV reste limitée aux souches d'herpèsvirus résistantes aux antiviraux de première ligne (voir partie 5.2.1).

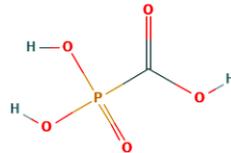
b) Brincidofovir

Le brincidofovir (CMX001 ; HDP-CDV) est un composé constitué d'un lipide (1-0-hexadécyl-oxypropyl [HDP]) lié de manière covalente au CDV (Figure 20D). L'ajout de ce groupement lipidique facilite le transport de la molécule dans la cellule. Contrairement aux pro-drogues classiques (VACV, VGCV), le brincidofovir n'est pas conçu pour délivrer la forme active (CDV) dans le plasma, mais pour la délivrer directement dans la cellule cible. En raison de sa capacité à délivrer une plus grande quantité de molécules actives aux cellules cibles, ce composé a un potentiel antiviral supérieur à celui du CDV. *In vitro*, il a été démontré que son activité antivirale était plus importante que celle du CDV contre les cinq familles de virus à ADN double-brin infectant l'homme, avec notamment une activité plus de 1 000 fois supérieure contre le VZV (Chemaly et al., 2019; Florescu and Keck, 2014; Hostetler, 2009). Contrairement au CDV, le brincidofovir n'est pas un substrat pour les transporteurs d'anions organiques, ce qui ne le rend pas néphrotoxique (Tippin et al., 2016). En effet, d'après les études de toxicité réalisées, aucune modification de la fonction rénale n'a été associée suite à son administration (Lanier et al., 2010; Painter et al., 2012). Par ailleurs, de nombreux essais cliniques de phase II et III sont actuellement en cours contre de nombreux virus à ADN. Les résultats obtenus avec le brincidofovir montrent l'avantage d'utiliser des conjugués lipidiques en tant qu'antiviraux afin de créer des médicaments avec de meilleurs profils pharmacocinétiques et moins toxiques. Ceci laisse entrevoir la création de plusieurs composés similaires dans un futur proche.

6.1.3. Autres molécules anti-herpétiques

a) Foscarnet

Le foscarnet, également appelé trisodium phosphonoformate, est un analogue de pyrophosphate qui a été découvert en 1978 par (Helgstrand et al., 1978) (Figure 21).



Foscarnet

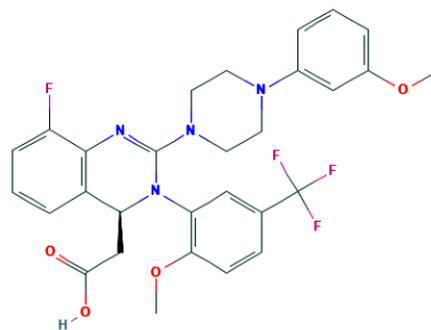
Figure 21 : Structure chimique du foscarnet.

In vitro, le foscarnet a un effet antiviral à large spectre, et son action a été démontrée contre les HSV-1 et -2, le VZV, le CMV, l'EBV, l'herpesvirus humain type 6 (HHV-6), le VIH et le virus de l'hépatite B (Crumpacker, 1992; Oberg, 1989). Son mode d'action diffère de ceux des molécules préalablement décrites. En effet, le foscarnet n'a besoin d'aucune étape de phosphorylation pour être actif. Cette molécule agit en se liant directement aux ADN polymérases virales comme un analogue de pyrophosphates. Il n'est donc pas incorporé dans le brin d'ADN en cours d'élongation mais bloque le site de liaison des pyrophosphates de l'ADN polymérase, ce qui met fin à la synthèse de l'ADN viral. Actuellement, cette molécule est utilisée pour traiter les patients infectés par des souches de HSV-1 et 2, de VZV et de CMV résistantes aux analogues acycliques de guanosine. En effet, le foscarnet reste actif contre différentes souches d'herpèsvirus ayant une mutation au niveau de la TK, les rendant résistantes à l'ACV et au GCV (Chatis et al., 1989; Cohen and Greenberg, 1985; Vinckier et al., 1987) (voir partie 5.2.2). Pour les infections au CMV, les traitements à base de foscarnet peuvent supprimer rapidement la virémie, mais leur utilisation est limitée en raison d'une forte néphrotoxicité et de perturbations électrolytiques importantes (Avery et al., 2016; Mincés et al., 2014). Les effets secondaires induits par cette molécule sont généralement des nausées, de la diarrhée, des vomissements, des maux de tête, de l'insuffisance rénale ou de l'hypocalcémie ionisée (Chrisp and Clissold, 1991).

b) Letermovir

Le letermovir (MK-8228 ou AIC246) est un dérivé de l'acide 3,4-dihydro-quinazoline-4-yl-acétique (Figure 22).

In vitro, ce composé s'est montré plus de 100 fois plus efficace que le GCV contre différentes souches de CMV (Goldner et al., 2011). Le letermovir inhibe le complexe



Letermovir

Figure 22 : Structure du letermovir.

terminase du CMV, codé par les gènes UL51, UL56 et UL89, nécessaire à l'encapsidation de l'ADN viral (Piret and Boivin, 2019). En ciblant la sous-unité pUL56 du complexe terminase, le letermovir bloque le clivage de l'ADN viral, empêchant son encapsidation et entraînant la production de particules non infectieuses (Goldner et al., 2014, 2011; Wildum et al., 2015). Le letermovir possède ainsi un mécanisme d'action unique qui se distingue des autres molécules antivirales utilisées jusqu'à maintenant contre le CMV. Cette molécule est donc prometteuse pour traiter les souches de CMV multi-résistantes aux antiviraux classiques. Elle a été utilisée avec succès chez un receveur de greffe pulmonaire atteint d'une souche de CMV multi-résistante (Kaul et al., 2011). Le letermovir a depuis passé les différentes phases cliniques (I, II et III) et est maintenant utilisé en prophylaxie contre le CMV chez les patients ayant subi une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (Marty et al., 2017).

c) Inhibiteurs de l'entrée du virus :

Il existe aujourd'hui trois molécules antivirales qui agissent sur l'entrée des herpèsvirus dans la cellule : le docosanol, inhibant l'entrée des HSVs, la varicella-zoster immunoglobulines (VariZIG) et la varicella-zoster immune globuline (VZIG) utilisés contre le VZV.

▪ Docosanol

Le docosanol est un alcool primaire saturé composé de 22 carbones (Figure 23). *In vitro*, cette molécule peut inhiber un grand nombre de virus possédant une enveloppe lipidique (Katz et al., 1991; Sacks et al., 2001). Le mécanisme d'action de ce composé reste encore discuté (Spruance, 2002). Il est néanmoins suggéré qu'il empêche l'entrée du virus dans les cellules épithéliales en agissant sur la liaison entre les récepteurs cellulaires et les protéines de l'enveloppe virale (Katz et al., 1991; Pope et al., 1998). Il a été démontré que l'utilisation d'une crème contenant 10% de docosanol permet de réduire significativement le temps de guérison et la durée des symptômes causés par les HVS-1 et HSV-2 (Sacks et al., 2001). Le docosanol a été approuvé par la Food Drug Association (FDA) en juillet 2000 et est utilisé contre les stades précoces d'éruptions cutanées labiales causées par les HSVs.



Docosanol

Figure 23 : Structure du docosanol.

▪ VZIG et VariZIG

La varicella-zoster immune globuline (VZIG) a été découverte en 1969 suite à l'extraction d'immunoglobulines de patients convalescents après une infection à VZV (Gershon A. A. et al., 1974). Des études sérologiques et cliniques ultérieures ont permis de démontrer que la VZIG diminuait le risque de complications et réduisait les formes cliniques

provoquées par le VZV chez les patients immunodéprimés (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1984; Zaia et al., 1983). A partir de 2004, l'utilisation de la VZIG a peu à peu diminué pour laisser place à un produit plus efficace, la varicella-zoster immunoglobulines (VariZIG). Approuvée par la FDA en décembre 2012, la VariZIG est une préparation stérile et lyophilisée d'immunoglobulines G (IgG) purifiées à partir de plasma humain contenant des niveaux élevés d'anticorps anti-VZV. La VariZIG offre une immunisation passive aux immunodéprimés afin de générer des anticorps IgG contre les infections à VZV (Marin et al., 2007). Ce composé est administré par voie intramusculaire aux patients ne présentant pas de preuve d'immunité au VZV (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012). Ce traitement provoque généralement des maux de tête et des douleurs au point d'injection. Il est recommandé d'utiliser des médicaments antiviraux tels que l'ACV en parallèle de ce traitement (Gardella and Brown, 2007).

6.2. Résistance aux thérapies actuelles

6.2.1. Emergence de souches d'HSV, de VZV et de CMV résistantes aux traitements par les antiviraux usuels

L'utilisation prolongée de molécules anti herpétiques peut conduire à l'émergence de souches virales résistantes (Castelo-Soccio, 2010; Kakiuchi et al., 2013; Latief et al., 2015; Pan et al., 2014; Turner and Beckingsale, 2013). Concernant les infections à HSV, une grande différence est observée entre les patients immunocompétents et les patients immunodéprimés. En effet, peu de cas d'HSV résistants à l'ACV ont été rapportés chez les patients immunocompétents (01 - 0,7 %) tandis qu'une plus forte proportion a été décrite chez des patients immunodéprimés (3,5 - 10 %) (Piret and Boivin, 2011). Parmi ces derniers, les patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques semblent les plus à même de développer des souches résistantes à l'ACV avec un taux d'émergence parfois supérieur à 36 % (Frobert et al., 2014). Cette différence peut être expliquée par le fait que les traitements antiviraux contre les HSVs chez les personnes en bonne santé sont généralement de courte durée, réduisant ainsi le risque d'apparition de souches résistantes. En revanche, les personnes immunodéprimées ont généralement besoin d'un traitement de longue durée, augmentant le risque de développer des souches résistantes à l'ACV.

A ce jour, il semble qu'un seul cas d'émergence de souche de VZV résistante à l'ACV ait été décrit chez un patient immunocompétent atteint d'une kératite herpétique (Gueudry et al., 2013). Plusieurs cas de patients immunodéprimés montrant des réactions à VZV et ne répondant pas à une thérapie à l'ACV ont été décrits. Cependant la prévalence de souches VZV résistantes à l'ACV n'a pas encore été déterminée (Piret and Boivin, 2016). Une étude a néanmoins rapporté que 27% des souches de VZV isolées chez des patients immunodéprimés présentaient des mutations possiblement liées à une résistance à l'ACV (van der Beek et al., 2013).

Concernant le CMV, l'émergence de souches résistantes au GCV et au VGCV semble varier entre 12 et 14 % chez des patients à haut risque (Eid et al., 2007; Young et al., 2016). Bien que la résistance à ces traitements semble liée à des facteurs provenant de l'hôte, comme un affaiblissement important des cellules T, elle est également induite par pression de sélection avec l'utilisation de molécules antivirales prolongée (Fisher et al., 2017; Razonable, 2018).

6.2.2. Mécanismes de résistance développés par les herpèsvirus face aux traitements antiviraux chez l'homme

La résistance des HSVs à l'ACV est principalement due à des mutations au niveau de la thymidine kinase virale (gène UL23). Les autres cas de résistance sont dus à une mutation au niveau de l'ADN polymérase virale (gène UL30) (Piret and Boivin, 2016). Ces deux gènes présentent un niveau élevé de polymorphisme naturel expliquant l'apparition de souches résistantes (Burrel et al., 2010; Schmidt et al., 2015). La majorité des résistances dans le gène UL23 sont causées par des additions ou délétions dans les séries d'homopolymères G/C conduisant à la formation de codons stop prématurés (Gaudreau et al., 1998; Sasadeusz et al., 1997). Les autres souches résistantes à l'ACV présentent des substitutions d'acides aminés dans les régions conservées et non conservées de la TK (Piret and Boivin, 2016; Sauerbrei et al., 2016).

Gaudreau et al. (1998) ont démontré que 50% des souches isolées résistantes à l'ACV possédaient des mutations au niveau du gène de la TK. Cependant, des études plus récentes rapportent des taux plus élevés, pouvant atteindre 80% (Burrel et al., 2013; Frobert et al., 2014). Tout comme les HSVs, les souches de VZV résistantes à l'ACV possèdent des mutations

au niveau du gène de la TK (gène ORF36) et plus rarement au niveau de l'ADN polymérase virale (gène ORF28) (Piret and Boivin, 2016). Le génome du VZV possède une teneur en G/C plus faible (46 %) que celle des HSV (68 %) et seuls quelques fragments d'homopolymères sont présents dans le gène de la TK (Andrei et al., 2012). Une succession de 6 cytosines en positions 492 à 498 de ce gène semble constituer un site important d'insertions/délétions de nucléotides provoquant l'apparition de résistance à l'ACV (Andrei et al., 2012; Morfin et al., 1999; van der Beek et al., 2013). Mais des substitutions de nucléotides réparties sur le gène de la TK du VZV ont également été décrites dans des cas de résistance à l'ACV (Morfin et al., 1999; Saint-Léger et al., 2001). Comme pour l'HSV et le VZV, la résistance des souches de CMV au GCV provient principalement de mutations sur le gène de la TK (UL97) et moins fréquemment sur celui de l'ADN polymérase virale (UL54) (Razonable, 2018). Pour ces trois virus, les mutations au niveau des TK virales provoquent des résistances aux analogues acycliques de guanosine (ACV, PCV, GCV et leurs pro-drogues) tandis que des mutations au niveau des ADN polymérases virales provoquent également des résistances au foscarnet et au CDV (Piret and Boivin, 2016, 2014; Razonable, 2018).

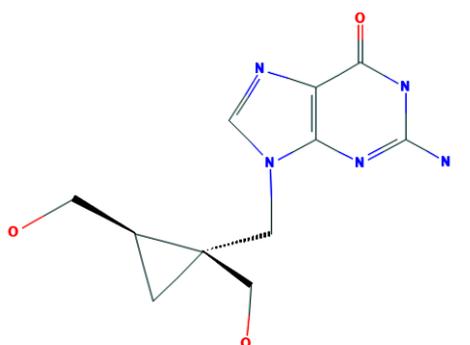
6.3. De nouveaux candidats pour lutter contre les herpèsvirus

La recherche de nouveaux composés antiviraux est un enjeu crucial pour lutter de manière toujours plus efficace contre les herpèsvirus et combattre les souches résistantes aux antiviraux de première ligne. Pour cela de nombreuses molécules avec des modes d'actions divers sont en cours de développement dont certaines sont présentées ci-dessous.

6.3.1. A-5021

La molécule A-5021 ou (1'S,29'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxyméthyl)cycloprop-1'-yl]méthyl]guanine est un analogue de guanosine décrit parmi une série de nouveaux analogues nucléosidiques en 1998 par une équipe japonaise (Sekiyama et al., 1998) (Figure 24). La molécule A-5021 est activée sous sa forme triphosphate et agit de la même façon que les analogues de guanosine (partie 6.1.1) (Ono et al., 1998). *In vitro*, A-5021 a montré un effet antiviral nettement supérieur à celui de l'ACV et du PCV contre l'HSV-1, l'HSV-2 et le VZV (Iwayama et al., 1998). *In vivo*, ce composé s'est montré très efficace contre des lésions cutanées et des encéphalites herpétiques induites par l'HSV-1 chez la souris (Iwayama et al.,

1999). Par ailleurs, un traitement oculaire avec cette molécule permet de réduire efficacement les kératites herpétiques induites chez la souris par l'HSV-1 (Itahashi et al., 2008). La majorité des recherches sur ce composé a été réalisée au début des années 2000. Cependant, aucun essai clinique ne semble avoir été entrepris depuis. A notre connaissance, l'utilisation de cette molécule en santé humaine semble abandonnée car une seule publication scientifique fait référence à cette molécule depuis 2008, et ce, dans le cadre de la lutte contre l'HVE-1 (Glorieux et al., 2012) (partie 7.1.4).



A-5021

Figure 24 : Structure de la molécule A-5021.

6.3.2. FV-100

L'analogie bicyclique de nucléotide Cf1743 (Figure 25) a été développé par McGuigan et al. (1999) et agit spécifiquement contre le VZV. En effet, cette molécule ne présente aucune activité contre l'HSV-1, l'HSV-2 et le CMV (McGuigan et al., 1999). Cette molécule possède une faible solubilité dans l'eau, entraînant une faible biodisponibilité (14%) lorsqu'elle est administrée par voie orale chez la souris (McGuigan et al., 2007). Ces résultats ont conduit au développement de sa pro-drogue, le FV-100 (3-[(2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxyméthyl)oxolan-2-yl]-6-(4-pentylphényl)furo [2,3-d]pyrimidin-2-one) (Figure 22) qui possède une solubilité 20 fois supérieure au Cf1743 (Migliore, 2010). Le FV-100 inhibe l'activité de l'ADN polymérase du VZV de façon spécifique (Dropulic and Cohen, 2010). *In vitro*, ce composé présente une efficacité 10 fois supérieure à celle de la BVDU et 100 fois supérieure à celle de l'ACV contre le VZV (McGuigan et al., 2007), ce qui en fait un très bon candidat pour le traitement d'infections à VZV. Le composé Cf1743 a été identifié comme substrat de la TK du VZV, mais son mécanisme d'action n'a pas encore été totalement élucidé.

Contrairement à l'ACV qui agit comme terminateur de l'élongation de l'ADN viral sous sa forme triphosphate, seule la forme diphosphate de cette molécule a été observée, suggérant un mode d'action différent. Par ailleurs, les souches résistantes à l'ACV avec des mutations au niveau de la TK sont également résistantes au Cf1743. Cependant, les souches résistantes à l'ACV avec des mutations au niveau de l'ADN polymérase restent sensibles à ce composé (Andrei et al., 2005).

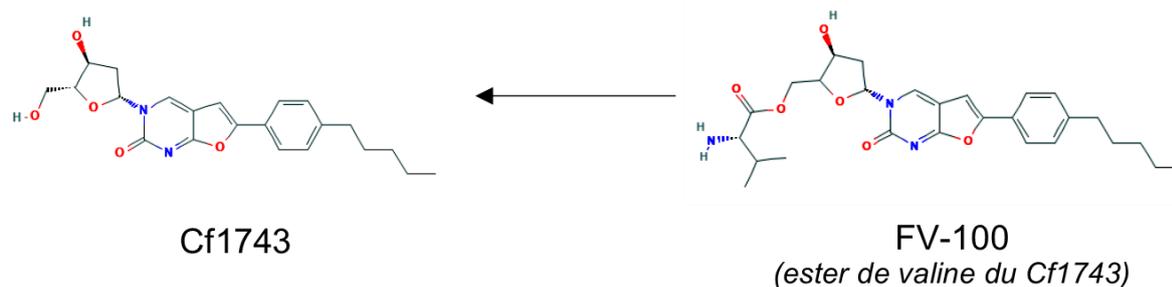


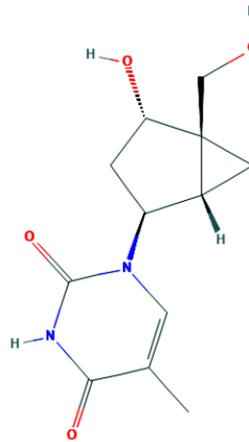
Figure 25 : Structure du composé Cf1743 et de sa pro-drogue, le FV-100.

En raison de sa très bonne activité et solubilité, le FV-100 a été utilisé lors d'essais cliniques (McGuigan et al., 2007). Un essai clinique de phase II a notamment permis de démontrer que l'administration journalière de 400 mg de FV-100 n'induisait pas d'effets indésirables sur des patients âgés de plus de 50 ans (Tyring et al., 2017) (ClinicalTrials.gov ; numéro d'enregistrement NCT00900783). Un essai clinique de phase III a débuté en décembre 2017 afin de comparer l'effet d'un traitement de 400 mg de FV-100 avec un traitement de 1000 mg de VGCV chez des patients atteints de zona aigu (ClinicalTrials.gov ; numéro d'enregistrement NCT02412917). Les résultats de cette étude ne sont cependant pas encore disponibles.

6.3.3. N-methanocarbothymidine

Le North-methanocarbothymidine (N-MCT) est un analogue de la thymidine incorporant un pseudo-sucre (Figure 26). Cette molécule a été décrite en 1996 par Marquez et a montré une très bonne efficacité antivirale *in vitro* contre les HSV-1, HSV-2 et le CMV (Marquez et al., 1996). *In vitro*, cette molécule montre un effet antiviral supérieur à celui de l'ACV et du GCV (Marquez et al., 2006; Zalah et al., 2002). *In vivo*, le N-MCT est très efficace comme traitement contre l'herpès génital provoqué par l'HSV-2 sur des modèles de cochons d'Inde (Bernstein et al., 2015, 2011; Quenelle et al., 2011). Le N-MCT, tout comme les

analogues de guanosine, nécessite trois étapes de phosphorylation pour être activé. Les deux premières étapes de phosphorylation sont réalisées par la TK virale tandis que la dernière se fait par une kinase cellulaire (Zalah et al., 2002). Un essai clinique de phase I a débuté en septembre 2016 afin d'évaluer sa toxicité et son niveau plasmatique chez des patients sains (ClinicalTrials.gov ; numéro d'enregistrement NCT02778386).



N-methanocarbothymidine

Figure 26 : Structure du N-methanocarbothymidine.

6.3.4. Les inhibiteurs d'hélicase-primase

Le complexe hélicase/primase (H/P) est responsable du déroulement de l'ADN viral, permettant la séparation de l'ADN double brin en deux brins simples au niveau de la fourche de réplication. Il est aussi responsable de la synthèse des amorces à ARN (fragments d'Okazaki). Le complexe H/P est constitué de trois protéines conservées entre les herpèsvirus : une hélicase (UL5 : HSV-1 ; VZVORF55 : VZV), une primase (UL52 : HSV-1 ; VZVORF6 : VZV) et une protéine accessoire possédant une activité Nucléoside triphosphate phosphohydrolase (NTPase) simple brin (UL8 : HSV-1 ; VZVORF52 : VZV) (Figure 27).

Trois inhibiteurs d'H/P ont été identifiés : BILS 22 BS, le pritelivir (BAY 57-1293) et l'amenamivir (ASP-2151) (Figure 28). BILS 22 BS est un dérivé de 2-amino-thiazolylphényl, découvert en 1998 par Spector et al. (1998) à la suite d'un criblage à haut débit de plus de 190 000 composés afin de trouver des inhibiteurs du complexe H/P. Un autre criblage de molécules a permis d'identifier des dérivés urinaires de thiazolés comme antiviraux contre les

HSVs ce qui a conduit à la synthèse d'un thiazolamide optimisé, le pritelivir (Kleymann et al., 2002).

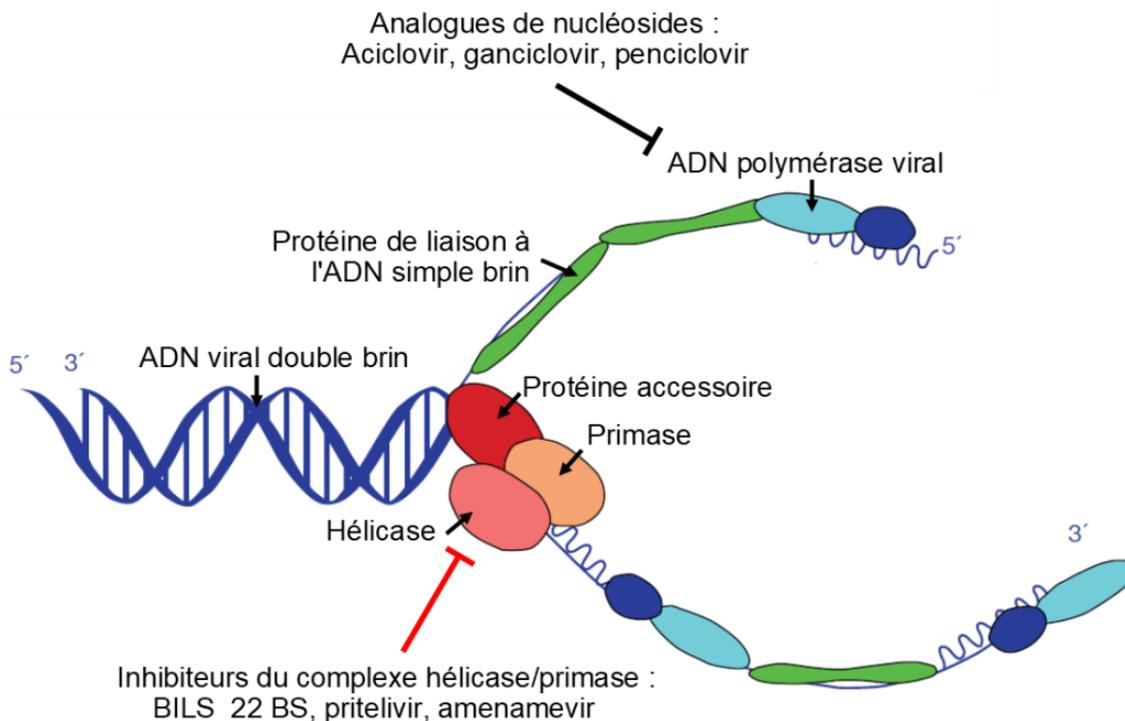


Figure 27 : Mécanismes d'inhibition de la synthèse des virus à ADN par les analogues de nucléosides et les inhibiteurs du complexe hélicase/primase (H/P). Le complexe H/P est constitué de 3 protéines : une hélicase, une primase et une protéine accessoire. Ce complexe déroule l'ADN double-brin au niveau de la fourche de réplication et amorce la synthèse d'un nouveau brin d'ADN. La protéine de liaison à l'ADN se lie ensuite à l'ADN simple brin à copier. L'ADN polymérase et sa protéine accessoire synthétisent le brin d'ADN secondaire à partir du brin leader. Les inhibiteurs du complexe H/P stabilisent la liaison de l'hélicase et de la primase à l'ADN viral, entraînant l'inhibition de l'activité de ces protéines et de la synthèse de l'ADN viral. Les analogues de nucléosides inhibent l'activité de l'ADN polymérase virale en s'y fixant. Schéma adapté d'après Biswas and Field (2008).

In vitro, le pritelivir et BILS 22 BS sont tous les deux plus efficaces que l'ACV contre les HSV-1 et HSV-2 mais ne présentent pas d'effet antiviral contre les autres herpèsvirus humains (Chono et al., 2010). L'amenamevir (ASP-2151) est un dérivé de l'oxadiazolephényle découvert en 2010 par Chono et al. (2010). Ce composé est efficace *in vitro* contre l'HSV-1, l'HSV-2 mais aussi contre VZV. Comme ces trois composés ne ciblent pas l'ADN polymérase virale et ne nécessitent pas d'étape de phosphorylation pour être activés, ils sont tous les trois efficaces contre les souches résistantes à l'ACV (Shiraki, 2018). Ces composés présentent

une faible toxicité *in vitro*, possèdent une bonne biodisponibilité et sont bien tolérés chez la souris. L'émergence de souches mutantes résistantes aux inhibiteurs d'H/P semble rare. Les souches d'HSV-1 et HSV-2 présentant des résistances à ces molécules correspondent à des souches possédant des mutations au niveau des gènes de l'hélicase et de la primase (Chono et al., 2012, 2010; Shiraki, 2018).

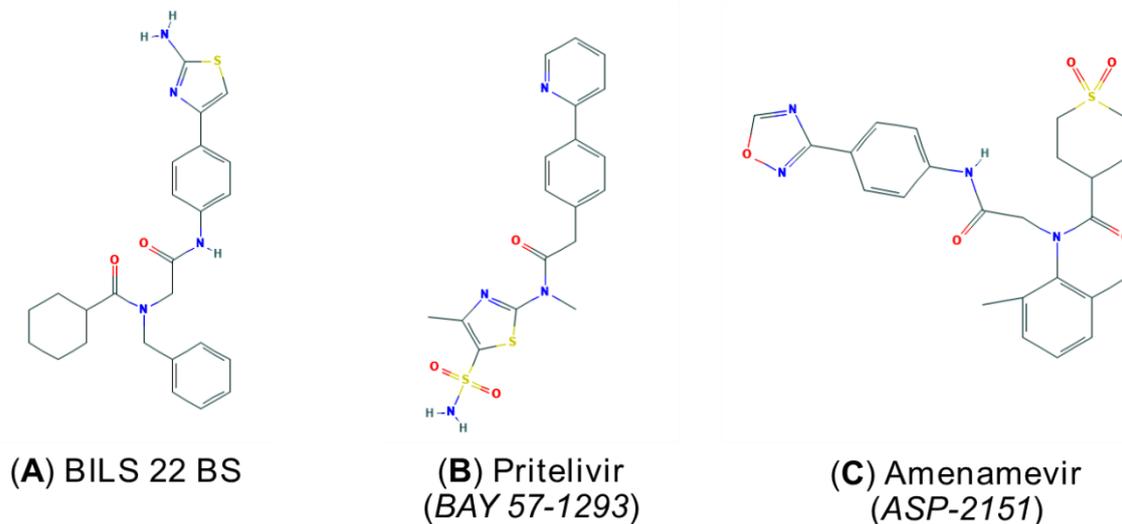


Figure 28 : Inhibiteurs du complexe hélicase/primase. Structure du BILS 22 BS (A), du pritelivir (B) et de l'amenamevir (C).

En raison de profils précliniques prometteurs en matière d'activité antivirale, de toxicité et de pharmacocinétique, le pritelivir et l'amenamevir, ont été récemment sélectionnés comme candidats au développement d'essais cliniques. Un essai clinique de phase I a été réalisé afin d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de l'administration orale d'une seule ou de plusieurs doses de pritelivir. Ces facteurs ont été étudiés pendant 28 jours chez 156 patients adultes atteints d'une infection au HSV-2 (Wald et al., 2014) ClinicalTrials.gov ; numéro d'enregistrement NCT01658826). L'excrétion virale ainsi que le nombre de jours où les patients présentaient des lésions ont été réduits de façon dose-dépendante. Aucun effet indésirable n'a été observé durant cette étude et l'efficacité du pritelivir ne semble pas varier en fonction du sexe (Wald et al., 2014). Un essai clinique de phase II comparant l'efficacité d'une dose orale quotidienne de 100 mg de pritelivir avec 500 mg de VACV a été interrompue après qu'une étude toxicologique ait révélé des complications dermiques et hématologiques chez des singes recevant des doses quotidiennes de pritelivir (Wald et al., 2016). Bien que les doses utilisées chez les singes soient bien supérieures à celles utilisées lors d'essais cliniques

chez l'homme, la nature de ces complications n'a pas encore été élucidée et fait l'objet d'études complémentaires (James et al., 2015). Un second essai clinique de phase II a vu le jour en 2017 afin d'évaluer la toxicité et l'efficacité du pritelivir chez des patients immunodéprimés présentant des lésions provoquées par des souches d'HSVs résistantes à l'ACV (ClinicalTrials.gov ; numéro d'enregistrement NCT03073967). Huit essais cliniques ont été réalisés afin d'évaluer la toxicité et l'efficacité de l'amenamevir chez des patients infectés par HSV-1, HSV-2 et VZV. Les résultats prometteurs de ces études ont permis à l'amenamevir d'être le premier inhibiteur du complexe H/P à être approuvé en usage clinique pour traiter des patients infectés par le VZV au Japon (Shiraki, 2018). A la vue des résultats obtenus avec le pritelivir et l'amenamevir, les inhibiteurs d'H/P semblent être la prochaine génération de médicaments pour lutter contre les infections liées aux herpèsvirus.

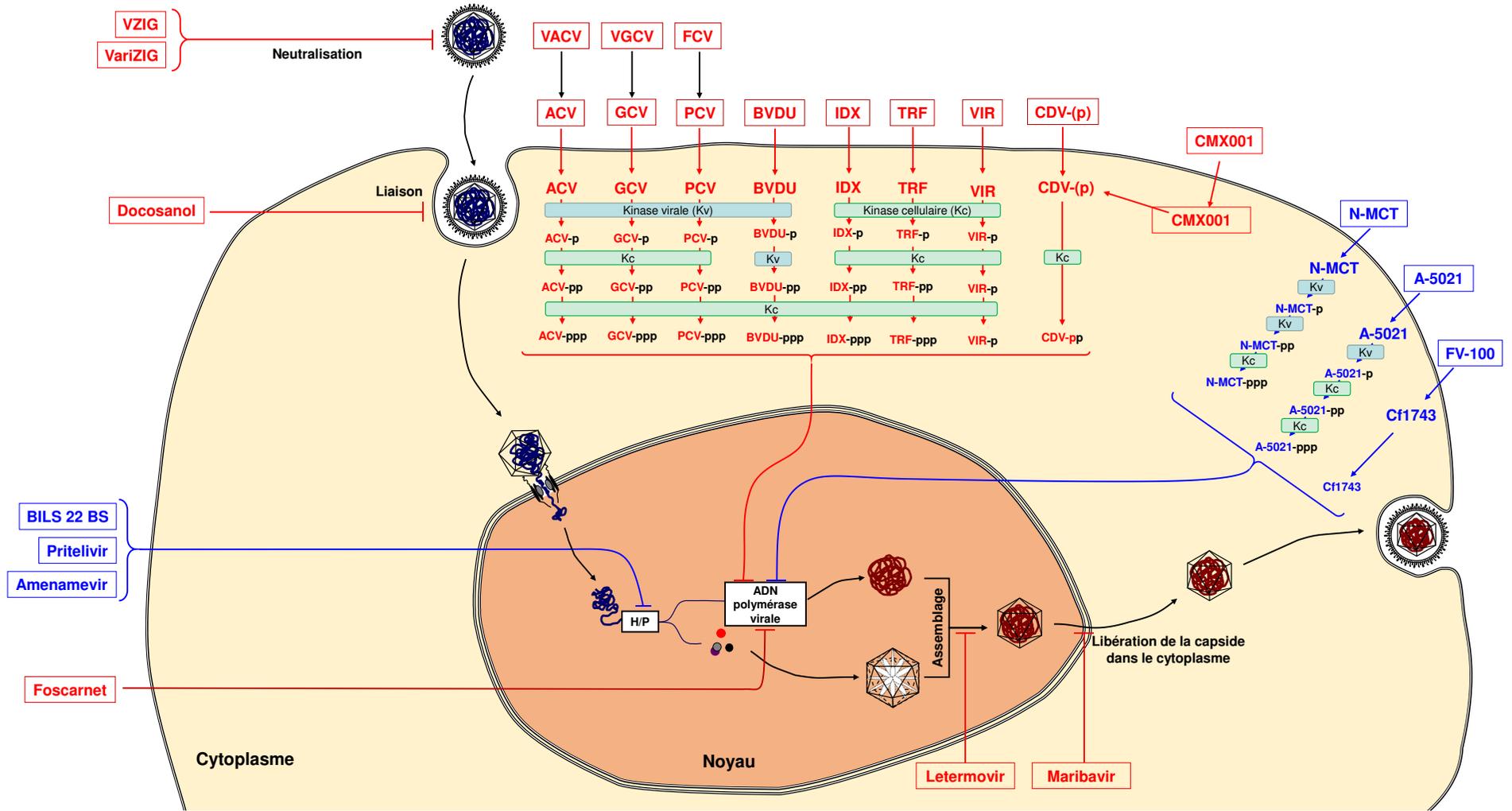


Figure 29 : Représentation schématique de l'activation et du mode d'action des molécules anti-herpétiques présentées dans ce manuscrit. Les molécules en rouge correspondent aux molécules utilisées actuellement pour le traitement des infections par des herpèsvirus humains tandis que les molécules en bleu correspondent aux molécules candidates pour lutter contre les herpèsvirus humains. Kv, kinase virale ; Kc, kinase cellulaire ; H/P, complexe hélicase/primase.

6.4. Le repositionnement de molécules : une stratégie prometteuse pour la découverte de nouveaux traitements contre les herpèsvirus

Il existe de nombreuses molécules efficaces pour lutter contre les herpèsvirus et d'autres sont actuellement en cours de développement (Figure 29). Cependant, le développement de ces composés est difficile car il nécessite du temps (minimum 10 à 12 ans) et coûte très cher (Sun et al., 2014). Une approche alternative pour identifier de nouvelles molécules efficace a vu le jour depuis maintenant plusieurs années. Il s'agit du repositionnement de molécules ou « Drug repositioning » comme décrit pour la première fois en 2004 par Ashburn and Thor. Ce concept vise à trouver de nouveaux usages à des molécules déjà approuvées pour des usages cliniques. Cette approche est maintenant incontournable pour répondre rapidement à l'émergence de nouveaux virus tels que le Sars-CoV-2 (Jourdan et al., 2020; Serafin et al., 2020), mais aussi pour lutter contre les souches résistantes aux traitements existants. Comme les données toxicologiques et pharmacologiques sont déjà bien décrites, le temps et le coût des premières phases de développement de ces molécules sont fortement réduits. De plus, comme ces composés sont déjà approuvés pour une ou des utilisations cliniques, leur introduction est facilitée pour une nouvelle utilisation. Il faut cependant faire attention, car les données de toxicité existantes sont liées à leur utilisation. En effet, un changement d'utilisation, de formulation ou de dosage nécessite une réévaluation des données toxicologiques (Jourdan et al., 2020). D'autre part, les taux de succès de développement de médicaments repositionnés sont plus élevés que ceux des nouveaux médicaments et peuvent atteindre 30 % (Nosengo, 2016). Les dernières technologies de pointe permettent maintenant de réaliser plus rapidement le criblage à haut-débit de banques de molécules. Ainsi, le repositionnement de molécule n'est plus une alternative mais une des solutions de premier choix pour le développement de nouvelles molécules antivirales.

7. Molécules antivirales utilisées contre l'HVE-1

L'effet antiviral d'une molécule est principalement évalué *in vitro* par le calcul de la concentration efficace médiane (EC_{50}), ce qui correspond à la quantité de molécules nécessaires pour diminuer de moitié l'effet du virus. Cette valeur peut également être appelée concentration inhibitrice médiane (IC_{50}). Il s'agit d'une valeur analogue à la concentration minimale inhibitrice (CMI) déterminée pour les molécules antibactériennes. Le calcul de l' EC_{50} correspond à la méthode de référence pour évaluer l'effet des molécules antivirales mais n'est pas standardisée, contrairement à la CMI. Le type cellulaire, les réactifs de laboratoire, le temps d'incubation et la méthode de lecture sont autant de facteurs pouvant affecter cette valeur (Weinberg et al., 2007).

De nombreuses molécules antivirales ont été testées *in vitro* contre l'HVE-1 (Tableau 2 : Valeurs des concentrations efficaces médianes (EC_{50}) des molécules antivirales testées *in vitro* contre l'HVE-1 lors de différentes études. EEL, cellules pulmonaires d'embryon équin ; EFL, cellules pulmonaires de fœtus équin ; FHK, cellules rénales de fœtus équin ; PK15, cellules épithéliales de rein porcin ; PRK, cellules rénales primaires de lapin ; RK13, cellules rénales de lapin.). La plupart d'entre elles sont des molécules utilisées contre les herpèsvirus humains ont été décrites dans la partie 5 de cette thèse. Cependant, l'efficacité d'autres composés plus originaux a également été rapportée. Aucune étude n'a évalué ni comparé la majorité des molécules efficaces contre l'HVE-1 en conditions standardisées afin de sélectionner les molécules les plus efficaces. Par ailleurs, aucune molécule antivirale ne possède d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en santé équine. C'est donc sous leur propre responsabilité que les vétérinaires peuvent être amenés dans certains cas à utiliser ces molécules.

Tableau 2 : Valeurs des concentrations efficaces médianes (EC_{50}) des molécules antivirales testées in vitro contre l'HVE-1 lors de différentes études. EEL, cellules pulmonaires d'embryon équin ; EFL, cellules pulmonaires de fœtus équin ; FHK, cellules rénales de fœtus équin ; PK15, cellules épithéliales de rein porcin ; PRK, cellules rénales primaires de lapin ; RK13, cellules rénales de lapin.

Familles	Molécules	Souches d'HVE-1	Cellules	EC_{50} (µg/mL)	Références	
Analogues de guanosine		Rac-H, H45	PK15	0,45	Rollinson & White, 1983	
		inconnu	PRK	1	De Clercq et al., 1984	
		Kentucky D (KyD)	PRK	7	De Clercq et al., 1986	
	Aciclovir (ACV)		Quai Hais	RK13	2,6	Boyd et al., 1987
			94P247, 97P70, 99P96,97P82, 99P136, 03P37	EEL	1,7 - 3,0	Garre et al., 2007
			89c25	FHK	2,7	Azab et al., 2010
			97P70, 03P37	EEL	5,30 - 5,85	Glorieux et al., 2012
			T953	EFL	11,4	Maxwell et al., 2017
	Ganciclovir (GCV; BW759U)		Rac-H, H45	PK15	0,015	Rollinson & White, 1983
			Rac-H, H45	RK13	≤0,10 - 0,02	Rollinson, 1987
			94P247, 97P70, 99P96,97P82, 99P136, 03P37	EEL	0,1 - 0,4	Garre et al., 2007
			89c25	FHK	0,1	Azab et al., 2010
			T953	EFL	0,1	Maxwell et al., 2017
Penciclovir (PCV; BRL 39123)		Quai Hais	RK13	1,6	Boyd et al., 1987	
		Ab4	RK13	1,64	de la Fuente et al., 1992	
		T953	EEL	4,8	Maxwell et al., 2017	
A-5021		97P70, 03P37	EEL	0,3 -0,4	Glorieux et al., 2012	
Analogue d'adénosine	Vidarabine (VIR; AraA)	Inconnue	PRK	2	De Clerq et al., 1984	
Analogues d'uridine		Idoxuridine (IDU)	PRK	0,2	De Clerq et al., 1984	
		Brivudine (BVDU)	PRK	300	De Clerq et al., 1984	
Analogues de nucléotides	HPMPA	Ab4	RK13	0,1	Field & Awan, 1990	
			RK13	0,1	de la Fuente et al., 1992	
	Cidofovir (CDV; HPMPC)	Ab4	94P247, 97P70, 99P96,97P82, 99P136, 03P37	EEL	1,1 - 6,7	Garre et al., 2007
			Ab4	RK13	0,07	Gibson et al., 1992
			Ab4	EEL	0,03	Gibson et al., 1992
	Adefovir (PMEA)	Ab4	94P247, 97P70, 99P96,97P82, 99P136, 03P37	EEL	2,8 - 5,6	Garre et al., 2007
			Ab4	RK13	5	Field & Awan, 1990
PMEDAP		97P70, 03P37	EEL	9,3 - 15,6	Glorieux et al., 2012	
Analogue de pyrophosphate	Foscarnet	94P247, 97P70, 99P96,97P82, 99P136, 03P37	EEL	6,6 -16,2	Garre et al., 2007	

7.1. Analogues de nucléosides

7.1.1. Analogues de guanosine

a) Aciclovir et valaciclovir

L'aciclovir (ACV) est la molécule anti-herpétique la plus étudiée contre l'HVE-1 notamment car elle est peu coûteuse. En effet, le critère financier est important lorsque l'on prend en compte le poids des chevaux et de la durée du traitement, qui peut s'étendre sur plusieurs semaines. *In vitro*, l'ACV possède une EC₅₀ variant de 0,45 µg/mL sur des cellules épithéliales de reins porcins (PK15) à 7 µg/mL sur des cellules rénales primaires de lapin (PRK) (Azab et al., 2010; Boyd et al., 1987; De Clercq, 1984; De Clercq et al., 1986; Garré et al., 2007; Glorieux et al., 2012; Maxwell et al., 2017; Rollinson and White, 1983).

La pharmacocinétique de l'ACV a été étudiée chez les chevaux. D'ailleurs, plusieurs études ont montré qu'une administration par voie intraveineuse d'ACV permettait d'atteindre les concentrations attendues d'ACV dans le plasma (Bentz et al., 2006; Garré et al., 2007; Wilkins et al., 2005). Lorsqu'il est administré par voie orale, l'ACV possède une faible biodisponibilité (<5%) entraînant une faible concentration d'ACV dans le plasma (Bentz et al., 2006; Garré et al., 2007; Razonable, 2011). Bien que la faible biodisponibilité orale soit une caractéristique bien connue de l'ACV (environ 20% chez l'homme) (de Miranda and Blum, 1983) et des analogues nucléosidiques apparentés, son absorption par voie orale chez les chevaux est beaucoup plus faible, ce qui remet encore plus en question l'intérêt de cette voie d'administration (Wong et al., 2010). L'ACV a été néanmoins administré par voie orale pour traiter des chevaux lors de foyers infectieux à HVE-1. Les bénéfices de ces traitements sont difficilement objectivables, à cause notamment du manque de contrôles et des conditions non standardisées de ces cas rapportés (Friday et al., 2000; Henninger et al., 2007; Murray et al., 1998).

Bien que variable, l'administration orale d'une seule dose de VACV, prodrogue de l'ACV, chez des chevaux adultes montre une bien meilleure biodisponibilité (26% à 60%) que l'ACV et permet d'obtenir une concentration plasmatique d'ACV supérieure à l'EC₅₀ pendant presque 2 heures (Garré et al., 2007; Maxwell et al., 2008). Par ailleurs il a été montré que

l'administration orale de 40 mg/kg de VACV toutes les 8 heures pendant 4 jours consécutifs permet de maintenir une concentration plasmatique d'ACV supérieure à l'EC₅₀ (Garré et al., 2007). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'administration de 27 mg/kg de VACV toutes les 8 heures pendant 2 jours suivie d'une administration de 18 mg/kg de VACV toutes les 12 heures (Maxwell et al., 2008). Malgré ces résultats prometteurs, les deux infections expérimentales par HVE-1 réalisées sur des chevaux ont donné lieu à des données controversées (Garré et al., 2009; Maxwell, 2017). Aucun effet bénéfique n'a été observé sur les signes cliniques, l'excrétion virale ou la virémie après administration orale de 40 mg/kg de VACV toutes les 8 h pendant 5 ou 7 jours consécutifs (Garré et al., 2009). Cependant, une diminution des signes cliniques, de l'excrétion virale et de la virémie a été observée après administration orale de 27 mg/kg de VACV toutes les 8 heures pendant 2 heures suivie d'une administration de 18 mg/kg toutes les 12 heures pendant 12 jours (Maxwell, 2017). Par ailleurs, la durée de la fièvre et le score clinique médian ont été significativement réduits lorsque la thérapie a été initiée avant l'inoculation du virus (traitement prophylactique) et maintenue pendant 2 semaines (Maxwell, 2017).

De façon surprenante, l'ACV n'a pas permis de réduire la formation de plaques induites par l'infection à HVE-1 sur des cultures d'explants de muqueuses nasales équine (Glorieux et al., 2012). Ces résultats observés *ex vivo* pourraient expliquer la faible efficacité du VACV lors des infections expérimentales précédemment décrites (Glorieux et al., 2012). La culture *ex vivo* d'explants de muqueuses respiratoires semble donc constituer un modèle très intéressant pour étudier l'effet de molécules antivirales.

b) Ganciclovir et Valganciclovir

Le ganciclovir (GCV) montre un très bon effet anti-HVE-1 *in vitro* avec une EC₅₀ comprise entre 0,02 µg/mL sur des cellules rénales de lapin (RK13) et 0,4 µg/mL sur des cellules pulmonaires embryonnaires équine (EEL) (Azab et al., 2010; Garré et al., 2007; Maxwell et al., 2017; Rollinson, 1987; Rollinson and White, 1983). Ce composé s'est avéré plus efficace que l'ACV, l'adéfovir, le CDV et le foscarnet lors d'une étude comparative basée sur le comptage du nombre de plaques infectieuses (Garré et al., 2007). Une étude plus récente a montré que le GCV pouvait réduire la taille des plaques infectieuses induites par l'HVE-1 et l'HVE-4 à des concentrations respectivement de 0,1 µg/mL et 2,5 µg/mL (Azab et al., 2010). Cette étude a également montré qu'une souche d'HVE-4 déficiente en TK était

résistante au GCV ($EC_{50} = 45 \mu\text{g/mL}$), ce qui confirme le rôle des TK virales pour phosphoryler et activer cette famille de molécules.

La pharmacocinétique du GCV par administration intraveineuse et du VGCV par voie orale ont été déterminées chez les chevaux. L'administration intraveineuse de 2,5 mg/kg de GCV toutes les 8 heures pendant 24 heures puis toutes les 12 heures permet d'obtenir une concentration plasmatique de GCV supérieure à sa EC_{50} durant toute la durée du traitement, et ce, sans atteindre des concentrations pouvant entraîner un effet toxique (Carmichael et al., 2013). La biodisponibilité du GCV après administration orale de VGCV a été évaluée à $41 \pm 20 \%$ et est comparable à celle du VACV (Carmichael et al., 2013). Par ailleurs, il a été prédit que l'administration de 3,2 mg/kg de VGCV toutes les 12 heures ne permettait pas d'atteindre une concentration suffisante de GCV au niveau plasmatique. Cependant, l'administration de 6,5 mg/kg de VGCV toutes les 12 heures semble suffisante pour atteindre cette concentration (Carmichael et al., 2013).

c) Penciclovir et Famciclovir

In vitro, le penciclovir (PCV) possède une EC_{50} allant de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ sur cellules RK13 à 4,8 $\mu\text{g/mL}$ sur cellules EEL (Boyd et al., 1987; de la Fuente et al., 1992; Maxwell et al., 2017). Le traitement de souris infectées par l'HVE-1 avec 2 doses journalières de 50 mg/kg de PCV a permis de réduire la réplication du virus dans les tissus respiratoires, les signes cliniques, la virémie et les lésions observées sur coupes histologiques (de la Fuente et al., 1992).

La pharmacocinétique du FCV, pro-drogue du PCV, a également été étudiée chez les chevaux. L'administration d'une seule dose de 20 mg/kg de FCV a permis d'atteindre des concentrations plasmatiques de PCV supérieures à l' EC_{50} (Tsujimura et al., 2010). Bien que la biodisponibilité du PCV n'ait pas été déterminée dans cette étude, les paramètres pharmacocinétiques obtenus sont proches de ceux du VACV.

d) A-5021

In vitro, le composé A-5021 a montré une efficacité 15 fois supérieure à celle de l'ACV pour inhiber la réplication virale ($EC_{50} = 0,3 - 0,4 \mu\text{g/mL}$) (Glorieux et al., 2012). Sur des cultures d'explants de muqueuses nasales équinées, modèle *ex vivo*, l'A-5021 inhibe totalement la formation de plaques infectieuses dès 8 μM (Glorieux et al., 2012). Ce composé semble prometteur pour traiter des chevaux infectés par l'HVE-1 mais des études

complémentaires de pharmacocinétique dans l'espèce équine sont nécessaires avant tout espoir d'utilisation.

7.1.2. Analogue d'adénosine

a) Vidarabine

La vidarabine n'a été évaluée qu'une seule fois contre l'HVE-1 *in vitro* et s'est montrée efficace avec une EC₅₀ de 2 µg/mL sur cellules PRK (De Clercq, 1984).

7.1.3. Analogues d'uridine

a) Idoxuridine et brivuridine

Sur cellules PRK, l'idoxuridine (IDU) a présenté une EC₅₀ de 0,2 µg/mL contre l'HVE-1 (De Clercq, 1984). Lors de cette étude, l'IDU s'est montrée 10 fois plus efficace que la vidarabine. Bien que la BVDU soit efficace contre d'autres herpèsvirus d'intérêt vétérinaire tel que BoHV-1 et SuHV-1 (De Clercq, 1984), cette molécule est peu efficace contre l'HVE-1 avec une EC₅₀ égale à 300 µg/mL. Ce résultat semble être expliqué par la faible capacité de la TK de l'HVE-1 à phosphoryler la BVDU sous sa forme active (Clercq, 1997).

7.2. Analogues de nucléotides

L'adéfovir, le CDV, l'HPMPA et le PMEDAP sont les 4 molécules de cette famille qui ont été testées *in vitro* contre l'HVE-1 (de la Fuente et al., 1992; Field and Awan, 1990; Garré et al., 2007; Gibson, 1992; Glorieux et al., 2012). Le CDV est la molécule la plus efficace sur cellules RK13 (EC₅₀ = 0,07 µg/mL) et sur cellules EEL (EC₅₀ = 0,03 µg/mL). Lors d'une étude comparative, le CDV s'est avéré être plus efficace que l'ACV, le GCV, l'adéfovir et le foscarnet pour réduire la taille des plaques infectieuses avec une EC₅₀ de 0,125 µg/mL (Garré et al., 2007). Par ailleurs, le traitement de souris infectées par l'HVE-1 avec 20 mg/kg de CDV permet de réduire les signes cliniques et les charges virales dans le tractus respiratoire (Gibson, 1992).

7.3. Foscarnet

Lors d'une étude comparant l'effet de cinq molécules antivirales contre l'HVE-1 *in vitro*, le foscarnet s'est montré être le moins efficace avec une EC₅₀ comprise entre 6,6 et 11,1 µg/mL (Garré et al., 2007). Par ailleurs son efficacité semblait varier en fonction des souches d'HVE-1 testées (Garré et al., 2007).

7.4. Autres composés testés contre l'HVE-1

Bien que la majorité des molécules antivirales connues pour lutter contre les herpèsvirus humains ont été testée *in vitro* contre l'HVE-1, d'autres molécules ont été évaluées contre ce virus afin d'élargir la gamme de potentiels traitements contre ce virus.

7.4.1 siRNA

Depuis maintenant plusieurs années, de nombreux progrès ont été faits sur l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA) pour traiter des infections virales. Deux siRNA ont été évalués *in vitro* contre l'HVE-1 : « sigB3 » ciblant l'ORF33 codant la glycoprotéine B, nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule et à sa diffusion cellule à cellule, et « siOri2 » ciblant l'hélicase, essentielle à la réplication du génome viral (Fulton et al., 2009). *In vitro*, ces deux siRNA sont capables d'inhiber le nombre et la taille des plaques infectieuses induites par l'HVE-1. Par ailleurs, l'utilisation de sigB3 et siOri2 en combinaison montre un effet additif (Fulton et al., 2009). Des souris infectées par l'HVE-1 et traitées par voie intranasale avec ces deux siRNA ont vu leurs signes cliniques, leur titre viral pulmonaire et leurs lésions pulmonaires fortement diminués. Une infection expérimentale réalisée chez le cheval avec deux traitements par voie intranasale d'un mélange contenant 750 pmol de sigB3 et 750 pmol de siOri2, à 12 heures pré- et 12 heures post-infection, n'a pas permis de réduire la fièvre, la virémie, ni le nombre de particules virales excrétées. Cependant, aucun cheval traité par ces siRNA (0/10) n'a dû être euthanasié, alors que 3 des 4 chevaux contrôles ont dû être euthanasiés suite à des complications nerveuses (Brosnahan et al., 2010). Ce dernier résultat est cependant à prendre avec beaucoup de précautions en raison de la forte hétérogénéité des individus de l'étude.

7.4.2. Extraits de plantes

Différents flavonoïdes ont été testés contre l'HVE-1. La quercétine et la morine ont montré une action virucide *in vitro* contre l'HVE-1 (Gravina et al., 2011). Cependant, l'acide trans-cinnamique, un précurseur de flavonoïde n'a pas montré d'effet antiviral (Gravina et al., 2011). Une infection expérimentale par HVE-1 sur modèle souris a montré que la quercétine ainsi qu'un extrait de *Bacharis dracunculifolia* permettaient de réduire les signes cliniques, la morbidité, la mortalité ainsi que le nombre et la taille des lésions provoquées (Ferreira et al., 2018).

7.4.3. Inhibiteurs d'histone déméthylase

Une étude *in vitro* a évalué l'effet contre l'HVE-1 du composé OG-L002, un inhibiteur de la protéine déméthylase 1 lysine-spécifique (LSD1), (Tallmadge et al., 2018). La protéine LSD1 module la méthylation des histones et l'utilisation d'un inhibiteur de cette protéine a montré un effet synergique avec l'ACV (Liang et al., 2009). Le composé OG-L002 a présenté un effet antiviral comparable au GCV sur cellules primaires de poumons foetaux équins (PFKC). Par ailleurs un effet synergique entre ces deux composés a pu être mesuré. Cependant un traitement avec le OG-L002 n'a pas permis de réduire le nombre de copies de génome d'HVE-1 sur des cultures de leucocytes (Tallmadge et al., 2018).

7.4.4. Alpha-hydroxytropolones

Plus récemment, des chercheurs se sont intéressés à l'effet antiviral des α -hydroxytropolones (α HT) contre de nombreux alphaherpèsvirus. Suite à un criblage de 26 α HT, 10 se sont montrés efficaces *in vitro* contre HSV-1 et HSV-2 (Ireland et al., 2016). Par la suite, 3 α HTs (α HT-106, α HT-111 et α HT-115) ont été évalués contre HSV-1, BoHV-1, FEH-1 et HVE-1. Parmi ces composés, seul le α HT-115 a permis de réduire de presque un logarithme décimal (Log_{10}) le nombre de plaques infectieuses provoquées par HVE-1 sur cellules rénales de bovins (MDBK) (Dehghanpir et al., 2018).

8. Utilisation d'antiviraux contre d'autres herpèsviroses dans le domaine vétérinaire

L'HVE-1 n'est pas le seul herpèsvirus fortement pathogène dans le domaine vétérinaire. Le développement de traitements antiviraux dans une espèce donnée peut ouvrir la voie à des travaux de recherche dans d'autres espèces animales, qu'il s'agisse d'animaux de compagnie, d'animaux de rente ou de la faune sauvage.

8.1. FeHV-1

Le felid alphaherpesvirus 1 (FeHV-1) provoque chez le chat, une rhinotrachéite principalement caractérisée par des symptômes respiratoires et une conjonctivite (Spradbrow et al., 1971). Une vingtaine de molécules antivirales ont été étudiées contre ce virus. Il s'agit principalement des analogues de nucléotides et de nucléosides décrits dans ce manuscrit contre l'HVE-1 (Thomasy and Maggs, 2016). Un modèle d'explant de cornée féline a récemment été développé et a permis de démontrer une activité 10 fois supérieure du CID par rapport à l'ACV contre le FeHV-1 (Pennington et al., 2016).

8.2. CaHV-1

Le canid alphaherpesvirus 1 (CaHV-1) peut infecter l'ensemble des canidés. Il entraîne des avortements, une infertilité et des mortalités (Hill and Maré, 1974). Des lésions oculaires sont également décrites de manière récurrente chez les chiens adultes (Ledbetter, 2013). Plusieurs traitements avec des solutions ophtalmiques ont été étudiés contre le CaHV-1. Un traitement oculaire avec des gouttes contenant 0.5% de CID a permis de réduire la durée d'excrétion virale mais est associé à une toxicité oculaire (Ledbetter et al., 2015). Des traitements oculaires avec des gouttes contenant 0,15% de GCV et 1% de TRF sont bien tolérés et permettent de réduire le score clinique, l'inflammation des tissus et la durée d'excrétion virale (Ledbetter et al., 2018; Spertus et al., 2016).

8.3. BoHV-1

Le bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) est responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine, qui se traduit par une atteinte des voies respiratoires supérieures, mais qui peut également provoquer des conjonctivites, des avortements, des métrites et des encéphalites chez le veau (Raaperi et al., 2014). *In vitro*, Le CDV et la curcumine ont présenté des effets anti-BoHV-1 sur cellules MDBK (Korvasová et al., 2012; Zhu et al., 2015). Il a également été démontré que le glutathion amplifie l'effet antiviral de l'ACV *in vitro* (Yuan et al., 2016). Une infection expérimentale par BoHV-1 chez des veaux a démontré qu'une dose de 20 mg/kg de CDV permettait de réduire les signes cliniques et la réplication du virus (Gilliam and Field, 1993).

8.4. GaHV-2

Le gallid alphaherpesvirus 2 (GaHV-2), également nommé « Marek disease virus » (MDV) est le pathogène responsable de la maladie de Marek, touchant principalement les élevages avicoles. Ce virus est très contagieux et provoque des lymphomes malins (Denesvre, 2013). L'ACV s'est montré efficace *in vitro* contre ce virus (Samorek-Salamonovicz et al., 1987; Wang et al., 2016). Par ailleurs, ce traitement a permis de réduire le développement de tumeurs induites par ce virus chez des oiseaux expérimentalement infectés (Samorek-Salamonovicz et al., 1987).

8.5. EEHV-1

L'elephantid betaherpesvirus 1 (ElHV-1) est responsable de maladies hémorragiques mortelles chez les jeunes éléphants d'Asie (*Elephas maximus*). Cependant, l'infection est généralement asymptomatique chez les éléphants adultes (Long et al., 2016). Plusieurs éléphanteaux de zoo asiatiques présentant des symptômes précoces de la maladie, à savoir une langue violette, une léthargie ou des œdèmes au niveau du visage et du cou semblent avoir été sauvés suite un traitement systémique de FCV (Schmitt et al., 2000). Huit éléphants du zoo de Houston ont également été traités au FCV et/ou GCV durant une épidémie à EEHV-1 (Stanton et al., 2013).

8.6. HVE-9

L'équid alphaherpesvirus 9 (HVE-9) est génétiquement très proche de l'HVE-1. Il est suggéré que le zèbre est l'hôte principal de ce virus (Borchers and Frölich, 1997; Guevara et al., 2018). Des cas fatals d'encéphalite ont également été rapportés chez l'ours polaire, le rhinocéros et l'onagre (Donovan et al., 2009; Schrenzel et al., 2008). Des études expérimentales ont également montré que les chiens, les chats et les chèvres sont sensibles à ce virus (Taniguchi et al., 2000; Yanai et al., 2003, 2003). Ce dernier semble infecter un large nombre d'hôtes, entraînant de sérieux problèmes dans les zoos. Une seule étude rapporte un traitement oral au valaciclovir chez deux zèbres en France (Leclerc et al. ; soumis).

Chapitre 2 :

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THÈSE

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre du programme SAVE (Stratégies AntiVirales Equines). Le Consortium SAVE regroupe cinq équipes françaises aux compétences complémentaires : trois équipes de virologistes équins appartenant à LABÉO/BIOTARGEN (équipe dirigée par le Dr Stéphane Pronost), à l'Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) de Normandie (équipe dirigée par le Dr Aymeric Hans) et à l'ANSES Maisons-Alfort (équipe dirigée par le Dr Stéphan Zientara), deux équipes de virologistes humains appartenant à l'Institut Pasteur de Paris (Dr Hélène Munier-Lehmann) et au Centre International de Recherche en Infectiologie de Lyon (équipe dirigée par le Dr Pierre-Olivier Vidalain) et l'équipe de chimistes du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN) dirigée par le Pr Patrick Dallemagne. L'objectif principal du consortium est d'élaborer une stratégie commune de recherche de molécules antivirales à large spectre pour lutter contre trois virus fortement pathogènes chez les équidés : l'herpèsvirus équin 1, le virus de l'artérite virale équine et le virus du Nil occidental (virus WestNile). Mon sujet de thèse s'inscrit dans ce contexte et vise au travers de trois objectifs principaux à identifier de nouvelles molécules antivirales pouvant agir contre les herpèsvirus équins, en particulier contre l'HVE-1 qui est responsable des formes les plus graves.

Le premier objectif était de développer un outil de criblage de molécules contre l'HVE-1 à moyen/haut débit. Nous nous sommes orientés vers une technologie innovante, le système RTCA xCELLigence®, que nous avons adapté à nos modèles cellulaires pour étudier *in vitro* et en temps réel l'effet antiviral de l'aciclovir et du ganciclovir contre l'HVE-1, l'HVE-4 et l'HVE-3. Cette preuve de concept était nécessaire et nous a permis de réaliser le criblage de 2 891 molécules issues de différentes chimiothèques.

Notre deuxième objectif consistait à caractériser les composés les plus efficaces identifiés lors du criblage. Nous avons donc évalué leurs effets sur différents modèles cellulaires et contre trois souches d'HVE-1 d'intérêt présentant les trois mutations connues au niveau de la position 2254 du gène de l'ADN polymérase (A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ et C₂₂₅₄). C'est également avec ces candidats que nous avons réalisé des études de combinaison afin de mettre en évidence d'éventuels effets synergiques pouvant présenter un avantage dans le traitement. Le mode d'action d'une molécule d'intérêt a également été étudié afin d'apporter de la connaissance sur les infections à HVE-1.

Le troisième objectif de ce travail de thèse consistait initialement en la réalisation d'une étude *in vivo* sur modèle souris des molécules possédant de bonnes efficacités *in vitro*. Le modèle souris présentant de nombreuses limitations d'une part et le contexte à LABÉO m'ouvrant la possibilité de réaliser un challenge sur poneys d'autre part, une étude expérimentale d'infection à HVE-1 pour mesurer l'effet du valganciclovir a été programmée dès la fin de ma première année de thèse. Au-delà de l'intérêt de tester *in vivo* l'effet du valganciclovir, ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant, cette étude expérimentale réalisée à la PlateForme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE, UE 1277) à l'INRAE de Nouzilly en février 2020 nous a donné l'opportunité de caractériser les effets de la nouvelle souche (FR-56628 ; C₂₂₅₄) isolée en France en 2018.

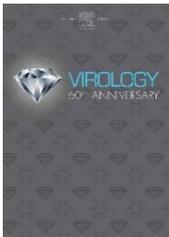
Chapitre 3 :

RÉSULTATS

1. Développement et preuve de concept de l'utilisation de l'impédancemétrie pour le suivi *in vitro* de l'infection par les alphaherpèsvirus équins et l'évaluation de molécules antivirales.

Article 1

C. J. Thieulent, E. S. Hue, C. I. Fortier, P. Dallemagne, S. Zientara, H. Munier-Lehmann, A. Hans, G. D. Fortier, P-H. Pitel, P-O. Vidalain, S.L. Pronost



Virology 2019 ; 526 : 105-116

PMID : 30388626

DOI : [10.1016/j.virol.2018.10.013](https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.013)

1.1. Introduction

L'herpèsvirus équin 1 (HVE-1) est un pathogène majeur chez les équidés. Bien que les symptômes respiratoires induits par ce virus passent généralement inaperçus chez les chevaux adultes, la lutte contre les avortements et les formes nerveuses de la maladie demeure encore un véritable enjeu pour la filière équine dans de nombreux pays. Ce virus possède un fort impact économique en France comme l'a montré l'épizootie survenue en 2018, durant laquelle plus de 75 foyers infectieux ont été déclarés par le RESPE, conduisant à l'annulation de plus de 200 compétitions équestres (Sutton et al., 2019). Il existe des vaccins pour lutter contre ce virus avec une efficacité démontrée pour réduire les signes respiratoires et la dissémination du virus, mais ceux-ci présentent des limitations, en particulier face aux avortements et aucune efficacité n'a pu être démontrée à ce jour contre la forme nerveuse. Contrairement à ce qui est observé avec la vaccination contre le virus de la grippe équine pour laquelle la couverture estimée à 87% est

satisfaisante (Fougerolle et al., 2019), la couverture vaccinale contre l'HVE-1 demeure encore insuffisante avec une estimation inférieure à 30%.

Face à ces limitations les acteurs de la filière équine se tournent de plus en plus vers l'utilisation de traitements antiviraux pour les formes graves. Bien que son efficacité ne soit pas clairement démontrée, l'aciclovir demeure la molécule utilisée sur le terrain. La recherche de nouveaux antiviraux présente donc un intérêt majeur pour la filière. Si plusieurs molécules ont été évaluées *in vitro* contre l'HVE-1 (Maxwell et al., 2017 ; Vissani et al., 2015), les études n'ont pas été réalisées de manière standardisée et ne permettent pas une bonne comparaison de l'efficacité de ces molécules avant d'envisager des études *in vivo*.

Le système Real Time Cellular Analysis (RTCA) xCELLigence® (Agilent) est une technologie de pointe permettant de suivre en temps réel et de façon non invasive les cellules par mesure de l'impédance cellulaire, et ce, sans marquage cellulaire (Fang et al., 2011 ; Limame et al., 2012). Pour cela, des plaques de culture spécifiques coatées avec des microélectrodes en or (Figure 30) sont utilisées.

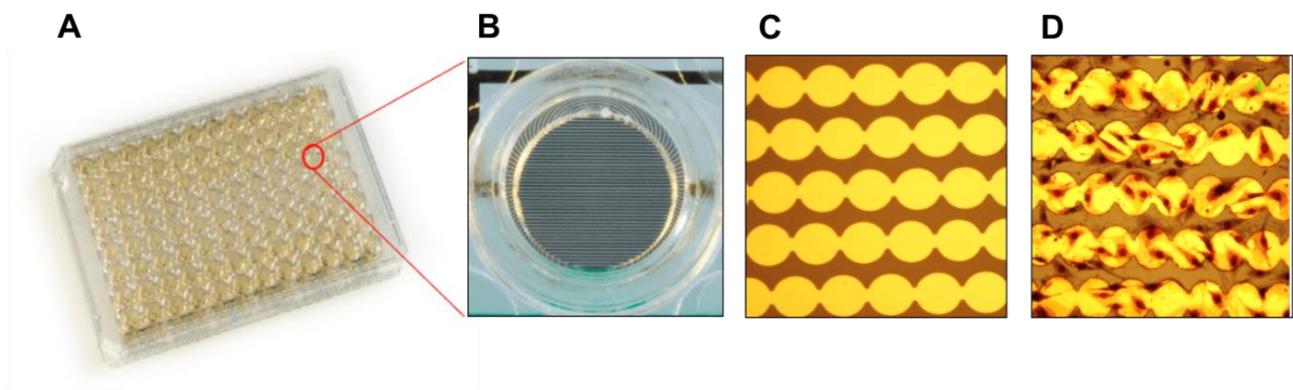


Figure 30 : Plaque de culture 96 puits avec des microélectrodes en or fixées au fond des puits (E-plate®) utilisée avec l'appareil RTCA xCELLigence®. (A) Image d'une E-plate® 96 puits. (B) Agrandissement sur l'un des puits de la E-plate®. Agrandissement sur les microélectrodes en or tapissant le fond des puits en absence (C) et en présence (D) de cellules. Source : <https://www.ols-bio.de/products/live-cell-analysis-system-xcelligence>.

L'appareil RTCA xCELLigence® envoie un signal électrique qui passe entre les électrodes (Figure 31). Ce signal est ensuite analysé par l'appareil qui le traduit en une valeur arbitraire appelée Cell Index (CI) qui est toujours représentée sous forme graphique (Figure 32). L'augmentation du nombre de cellules sur les électrodes provoque une augmentation du CI. A l'inverse, la destruction du tapis cellulaire induit la diminution du CI. La présence de cellules adhérentes modifie l'impédance mesurée, ce qui permet de suivre la viabilité cellulaire, la migration, la croissance et toutes autres modifications cellulaires, notamment la présence d'effets cytopathiques (ECP).

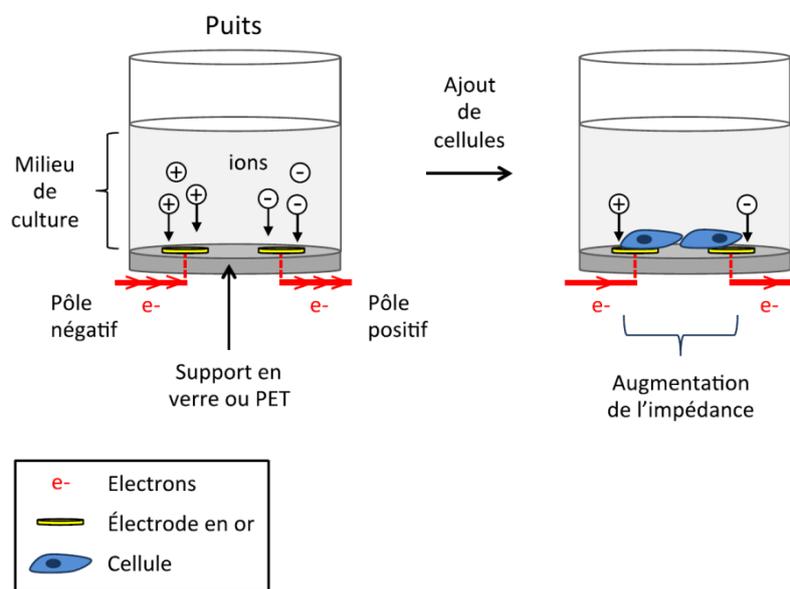


Figure 31 : Représentation schématique des puits des E-plate® permettant la mesure de la variation d'impédance cellulaire. Le signal électrique envoyé par l'appareil RTCA xCELLigence® arrive au niveau du pôle négatif. Il passe ensuite par le milieu de culture pour rejoindre le pôle positif. La présence de cellules adhérentes sur ces électrodes induit une variation du signal électrique. Source : <https://www.arpege.cnrs.fr/>.

Golke *et al.* (2012) ont d'ailleurs investigué, pour la première fois, l'application de cette technologie afin d'évaluer l'apparition d'ECP induits par deux souches d'HVE-1. Les résultats obtenus, bien que préliminaires, ont montré le potentiel de cette technologie pour l'étude de ce virus.

Notre étude présente le développement du système RTCA xCELLigence® au sein du laboratoire dans le but de suivre en temps réel l'apparition d'ECP induit par l'HVE-1 sur cellules équinaes dermiques (ED). Il s'agit d'une preuve de concept qui vise à démontrer l'efficacité de ce

système pour i) évaluer l'effet de l'aciclovir et du ganciclovir contre l'HVE-1, mais également contre deux autres alphaherpèsvirus, l'HVE-3 et l'HVE-4 et ii) réaliser le criblage d'un grand nombre de molécules contre l'HVE-1 en conditions standardisées.

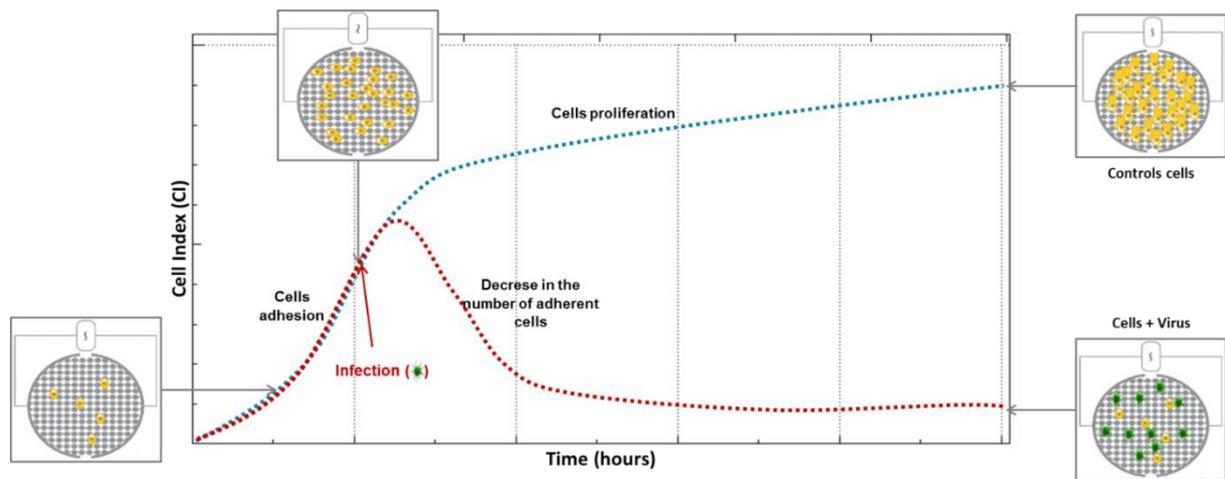


Figure 32 : Représentation graphique de l'évolution du Cell Index au cours du temps. La courbe bleue représente le Cell Index de cellules non infectées tandis que la courbe rouge représente le Cell Index de cellules infectées.

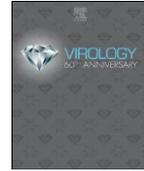
1.2. Article 1

Virology 526 (2019) 105–116



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virology

Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay

Côme J. Thieulent^{a,b,1}, Erika S. Hue^{a,b,c,1}, Christine I. Fortier^{a,b,c}, Patrick Dallemagne^d, Stéphane Zientara^e, Hélène Munier-Lehmann^f, Aymeric Hans^g, Guillaume D. Fortier^{a,b}, Pierre-Hugues Pitel^a, Pierre-Olivier Vidalain^h, Stéphane L. Pronost^{a,b,c,*}

^a LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France

^b Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450, 14280 Saint-Contest, France

^c Normandie Univ, UNICAEN, ImpedanCELL core facility, SF 4206 ICORE, 14280 Saint-Contest, France

^d Normandie Univ, UNICAEN, CERMN EA4258, 14000 Caen, France

^e Université Paris-Est, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, INRA, ENVA, UMR 1161 Virologie, 94700 Maisons-Alfort, France

^f Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, CNRS UMR 3523, 75015 Paris, France

^g ANSES, Laboratoire de pathologie équine de Dozulé, Unité de virologie et parasitologie équine, 14430 Dozulé, France

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Aciclovir
Antiviral
Equid herpesviruses
Ganciclovir
Impedance
Real-time cell analysis
Screening
Spironolactone
xCELLigence

ABSTRACT

Equid alpha-herpesviruses (EHV) are responsible for different diseases in equine population. EHV-1 causes respiratory diseases, abortions and nervous disorders, EHV-4 causes respiratory diseases and sporadic abortion, while EHV-3 is responsible of equine coital exanthema. In view of the lack of efficacy of vaccines against EHV-1 and EHV-4 and in the absence of vaccines against EHV-3, the use of antiviral treatment is of great interest. In this study, we documented the interest of the Real-Time Cell Analysis (RTCA) technology to monitor the cytopathic effects induced by these viruses on equine dermal cells, and established the efficacy of this method to evaluate the antiviral effect of aciclovir (ACV) and ganciclovir (GCV). In addition, the RTCA technology has also been found appropriate for the high-throughput screening of small molecules against EHV, allowing the identification of spironolactone as a novel antiviral against EHV.

1. Introduction

Herpesviruses (order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*) are enveloped viruses with a linear, double-stranded DNA genome of 125–290 kb. Five herpesviruses have been reported to infect horses, named equid herpesviruses (EHV)-1 to 5. While EHV-2 and 5 are classified as *Gammaherpesvirinae*, EHV-1, -3, and -4 belong to the *Alphaherpesvirinae* subfamily (Davison et al., 2009). EHV-1 is the most pathogenic and is endemic worldwide (Lunn et al., 2009). After the initial replication phase that takes place in the respiratory epithelium and draining lymph nodes, EHV-1 spreads to other organs during the cell-associated viraemia and may induce secondary forms of disease (Paillot et al., 2008). EHV-1 is a major cause of abortion in mares due to infection of endometrial endothelial cells and fetuses (Léon et al., 2008). Besides, EHV-1 can also reach the central nervous system, infect endothelial cells, and cause equine herpesvirus myeloencephalopathy (Pusterla and

Hussey, 2014). Clinical signs of neurologic dysfunction are ranging from a mild ataxia of one limb to a total paralysis, often requiring euthanasia and outbreaks of EHV occur worldwide (Barbić et al., 2012; Friday et al., 2000; Goehring et al., 2006; Henninger et al., 2007; Mori et al., 2011; Pronost et al., 2012; Traub-Dargatz et al., 2013). EHV-1 strains are usually classified into abortigenic or neurologic viruses, depending of the clinical complications induced. It has been proposed that a single amino acid change in the DNA polymerase determines the outcome of the disease, but this is still discussed (Nugent et al., 2006; Pronost et al., 2010). EHV-4, also named rhinopneumonia virus, is closely related to EHV-1 but mostly causes respiratory disease and only sporadic abortion and neonatal infection in horses (Patel and Heldens, 2005). EHV-3 is distinct from previous viruses and is responsible for equine coital exanthema, characterised by the formation of papules, pustules, ulcers and vesicles on the external genitalia of horses (Barrandeguy and Thiry, 2012). Finally, EHV-5 often persist and induce

* Correspondence to: LABÉO Frank Duncombe, 1 route de Rosel, 14280 Saint-Contest, France.

E-mail address: stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr (S.L. Pronost).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.013>

Received 14 September 2018; Accepted 14 October 2018

0042-6822/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

latent infections usually characterised by an absence of clinical signs, thus representing a real risk to horse populations. As a consequence, economical losses linked to EHV infections are very significant, which warrants surveillance and prophylaxis (Kydd et al., 2012).

Several vaccines are available against EHV-1 and EHV-4. Although they reduce both clinical signs of the respiratory disease and virus shedding (Goodman et al., 2006), their efficacy against neurological disorders and abortion is limited (Kydd et al., 2012; Lunn et al., 2009; Patel and Heldens, 2005). Moreover, there is no vaccine against EHV-3. In view of these limitations, veterinary practitioners have turned toward alternative treatments and the use of antiviral is raising interest. Currently, no antiviral molecule has a marketing authorisation for equine species despite critical needs, warranting the development of new antiviral compounds or adaptation of drugs that are effective against human viruses (reviewed in Vissani et al., 2016). Two nucleoside analogues, aciclovir (ACV) and ganciclovir (GCV), are the most studied antiviral compounds against herpesviruses. *In vivo*, valaciclovir, which is the prodrug of ACV, was tested in experimental EHV-1 infection, but showed no antiviral effects (Garre et al., 2009). Quite surprisingly, the antiviral properties of GCV was never evaluated in horses despite interesting pharmacokinetic results (Carmichael et al., 2013). Nevertheless, both drugs were effective *in vitro* against EHV-1 (Garre et al., 2007), EHV-4 (Azab et al., 2010) and EHV-3 (Vissani et al., 2018), but the diversity of experimental designs and the lack of normalised assays make it difficult to compare the efficacy of these drugs on the different EHV.

Conventional approaches for screening antivirals include the quantification of viral progeny in plaque assays, 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀), or quantitative PCR, which are all time-consuming and tedious end-point assays. Alternative methods were developed to quantify cell protection from viral cytopathic effects by measuring either mitochondrial succinate-dehydrogenase activity with the MTT assay (Sudo et al., 1995), or intracellular ATP concentration with firefly luciferase (Noah et al., 2007). More recently, recombinant viruses expressing reporter proteins such as luciferase were also developed, but this approach is limited to viruses that can be modified by reverse genetics (Lucas-Hourani et al., 2014). In the last two decades, the use of label-free technologies in drug discovery received an increasing attention (Cooper, 2006). The Real-Time Cell Analysis (RTCA) system is an advanced label-free technology that measures cell growth using impedance variations in culture wells covered with gold electrodes (Solly et al., 2004). Impedance is modified by the presence of adherent cells in the wells, which can be used to monitor cell viability, migration, growth, spreading, proliferation and any modification due to viral cytopathic effect (Fang et al., 2011; Limame et al., 2012). A previous work investigated the applicability of RTCA to analyse the cytopathic effect of two different strains of EHV-1 infection (Golke et al., 2012). The current study is pushing further this approach by demonstrating that RTCA is a powerful technology for the evaluation of antivirals against EHV-1 but also EHV-4 and EHV-3, and is suitable for the screening of compound libraries when looking for new inhibitors of these viruses.

2. Materials and methods

2.1. Cells

Equine dermal (E. Derm; NBL-6) cells (ATCC® CCL57™, Manassas, VA) were maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM; ATCC®) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, Courtabouf, France), 100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B (Eurobio) at 37 °C and 5% CO₂.

2.2. Viruses

Three EHV-1 strains were used throughout this study: Kentucky D

Table 1

Multiplicity of infection used for each virus strains during equine dermal cells infection. M.O.I., Multiplicity of infection: the number of virus particles added per cell.

Virus (strain)	EHV-1 (KyD) ^a	EHV-1 (FR-6815) ^b	EHV-1 (FR-38991) ^b	EHV-4 (405/76) ^a	EHV-3 (1118) ^a
M.O.I. used	0.02	0.6	0.4	0.23	0.01

^a : ATCC®.

^b : LABÉO.

(KyD) strain (ATCC® VR700™), isolate FR-6815 obtained from organs of an aborted fetus in 2013 (LABÉO, France), and isolate FR-38991 from the nasal swab of a horse with neurological disorders in 2009 (LABÉO, France). Two other EHV strains were used: EHV-4 405/76 strain (ATCC® VR-2230™) and EHV-3 1118 strain (ATCC® VR-352™). The different multiplicities of infection (MOI) used in this study are indicated in Table 1.

2.3. Chemical compounds

Aciclovir was purchased from Abcam (Cambridge, UK), ganciclovir, brequinar and spironolactone were purchased from Clinisciences (Nanterre, France). One plate from the Prestwick Chemical Library® (containing 80 compounds) was selected (part of the chemical libraries available on the CBC platform) as it contains aciclovir (well A07).

2.4. Cytotoxicity assay of chemical compounds

2.4.1. Trypan blue staining

Cell viability was measured at 48 h post-treatment (hpt) using a trypan blue solution at 0.4% (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France), according to the manufacturer's instructions.

2.4.2. Luminescence-based viability assay

Cell viability was measured at 48 hpt using the CellTiter Glo® Luminescent Cell Viability Kit (Promega, Charbonnière-les-bains, France), according to the manufacturer's instructions. This assay quantifies ATP in culture wells, which reflects cellular metabolic activity. Signal was acquired using an Infinite® M200 luminometer (Tecan, Lyon, France).

2.5. Real-time cell monitoring of EHV-induced cytopathogenicity using RTCA

Real-time cell impedance was monitored using the RTCA MP system (ACEA Biosciences, Montigny le Bretonneux, France), with 6 independent positions for 96-well E-plates (ACEA Biosciences). The impedance signals measured by the electronic sensor analyser were derived in a dimensionless value, called Cell Index (CI) and graphically represented. The background readings were obtained with EMEM in each well of the E-plate view PET (ACEA Biosciences). Cells were then seeded at a density of 1.2×10^4 per well (adapted from Tian et al., 2012), incubated at room temperature for 30 min, and then placed onto the RTCA-MP station located in the incubator. CI values were measured automatically every minute during the first 10 h, and then every 15 min the next 14 h. After 24 h of incubation, medium was removed and cells were infected with the different EHV strains (Table 1) with or without chemical compounds. Negative controls were mock infected with medium and DMSO. Plates were put back onto the RTCA MP station, and the CI values were recorded every 10 min during 120 h. According to the manufacturer's recommendations, CI values were first normalised to match the last time point before cell infection using the RTCA software version 2.0 (ACEA Biosciences) prior to data analysis. Finally, three representative values were calculated for each culture conditions:

half maximal effective concentrations (EC₅₀), area under normalised curves (AUC_n; Pan et al., 2013), and times required for the CI to decrease by 50% after virus infection (CIT₅₀; Fang et al., 2011). The quality of the screening in 96-well format was warranted using the Z'-factor calculation (Zhang et al., 1999) based on AUC_n values between 0 and 120 h post-infection (hpi). The formula is: $Z' = 1 - 3 \times (\sigma^+ + \sigma^-) / (\mu^+ - \mu^-)$, where σ^+ and σ^- correspond to standard deviations of AUC_n for uninfected and infected cells with DMSO, respectively; and μ^+ and μ^- correspond to means of AUC_n for uninfected and infected cells with DMSO, respectively. Z'-factor is expected to be above 0.5, or the corresponding plate is discarded.

2.6. Nucleic acids and qPCR

In parallel to each real-time monitoring, 96 well plates were prepared with the same culture conditions as outlined above to perform qPCR. Cell cultures were frozen at -20 °C at different time points: 0, 24 and/or 48 hpi. Nucleic acids were extracted with the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions and stored at -20 °C until used. Quantitative PCR protocols for EHV-1, EHV-4 and EHV-3 adapted from the standard NF U47-600-2 have been previously described (Hue et al., 2016). Each reaction was processed in a total volume of 25 µl containing 2 × Taqman® Universal PCR Master Mix (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France), primers and probes (Table 2). Each thermal cycling described in Table 2 was performed on a QuantStudio™ 12 K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies).

2.7. Cell morphology analysis

For both assays, cell morphology and viral cytopathic effects (CPE) were observed using the inverted Eclipse Ti microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). Apoptosis tests were observed using IncuCyte S3 (Essen Bioscience, Ann Arbor, Michigan, USA) with IncuCyte Caspase 3/7 Green Reagent (Essen Bioscience).

2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism® software version 6.0 (La Jolla, CA, USA). Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). Normality of continuous data distribution was evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test. Viral loads being not normally distributed were log-transformed before comparison by ANOVA, with Tukey and Dunnett post hoc tests when appropriate. Cell viability tests were compared using ANOVA, with Bonferroni and Dunn post hoc tests when appropriate. Values of P < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Real-time monitoring of EHV-1-induced cytopathic effects

Cytopathic effect induced by EHV-1 (KyD strain) infection of E. Derm cells was monitored by RTCA (Fig. 1A). From 24 h before infection (seeding step) to 20 h before infection, the normalised cell index (CI_n) rapidly increased due to cell adhesion. From 20 h before infection to the infection time (0 h), CI_n values slowly increased as a result of cellular proliferation, and this continued over time for mock-infected cells (Fig. 1A; red curve). In infected culture conditions, the CI_n began to decrease from 24 hpi (Fig. 1A; purple curve), which corresponds to the first virus-mediated cytopathic effects (CPE) visualised by microscopic observation (Fig. 1C - 24 hpi). The decrease in the CI_n values intensified to reach zero at 48 hpi (Fig. 1A), with no more adherent cells present in the culture (Fig. 1C - 48 hpi). In parallel, viral growth was measured by qPCR at 0, 24 and 48 hpi (Fig. 1B). EHV-1 genome copies increased significantly (P < 0.001) and gradually in line with virus-mediated CPE formation and inversely with the CI_n decreasing. However, no alteration in cell viability was observed at 48 hpi in infected conditions, when measured by trypan blue staining or ATP quantification (Supplementary Fig. 1A and B, respectively). Moreover, no cleavage of Caspases 3/7 was observed during the first 48 h of infection (Supplementary Fig. 1C).

3.2. Effect of aciclovir and ganciclovir against three different EHV-1 strains

The absence of cytotoxicity was confirmed for ACV and GCV at the different concentrations tested (Supplementary Fig. 2). Antiviral effect of ACV or GCV against the EHV-1 KyD strain was evaluated by RTCA. Results showed that ACV prevented the CI_n decrease induced by EHV-1 infection in a dose-dependent manner (Fig. 2A). Aciclovir significantly reduced the number of viral genome copies in EHV-1 infected E. Derm cells by 1.5 log₁₀ (P < 0.001) and 2.8 log₁₀ (P < 0.001) at 5 µg/ml and 50 µg/ml, respectively (Fig. 2B). Ganciclovir was even more potent as concentrations of 0.5–50 µg/ml strongly limited the CI_n decrease induced by EHV-1 infection (Fig. 2C), whereas a concentration of 0.05 µg/ml slightly delayed the CI_n decrease induced by EHV-1 infection. Quite similarly, GCV significantly reduced the number of viral genome copies by 1.5 log₁₀ (P < 0.001), 2.4 log₁₀ (P < 0.001) and 2.4 log₁₀ (P < 0.001) at 0.5 µg/ml, 5 µg/ml and 50 µg/ml, respectively (Fig. 2D). The cell morphology profiles observed by microscopy support these results (Fig. 2E). The susceptibility of two other EHV-1 strains (FR-6815 and FR-38991) to ACV and GCV was evaluated in E. Derm cells by RTCA and qPCR, and corroborate the results obtained the KyD strain (Fig. 2F). No significant difference (P < 0.001) was observed between the three different EHV-1 isolates (Fig. 2F; mean EC₅₀ ± SD at 48 hpi). Furthermore, and regardless of the method used, the EC₅₀ values for GCV (RTCA mean value: 1.01 ± 0.53 µg/ml) were approximately 10-fold lower than for ACV (RTCA mean value: 10.28 ± 2.31 µg/ml).

Table 2

Sequences of primers, probes and amplification programs used for the detection of equid alphaherpesviruses. F: forward primer; R: reverse primer; P: probe; MGB: minor groove binder.

Targets	Primers and probes sequences (5'-3')	Amplification programs	References
EHV-1	F: CATGTCAACGACTCCGA	95 °C 10 min	Adapted from (Diallo et al., 2006)
	R: GGGTCGGGGCTTCTGT	95 °C 15 s	
	P: FAM-CCCTACGCTGCTCC-MGB	62 °C 1 min	
EHV-4	F: GGGCTATTGGATTACAGCGAGAT	95 °C 10 min	Adapted from (Diallo et al., 2007)
	R: TAGAATCGGAGGGCGTGAAG	95 °C 15 s	
	P: FAM-CAGCGCCGTAACCCAG-MGB	60 °C 1 min	
EHV-3	F: GACGGTACCAACGATCG	95 °C 10 min	Adapted from (Léon et al., 2008)
	R: GGCCAACTTCCCGAG	95 °C 15 s	
	P: FAM-GCGAGACATGCTGCTAGGCA-MGB	60 °C 1 min	

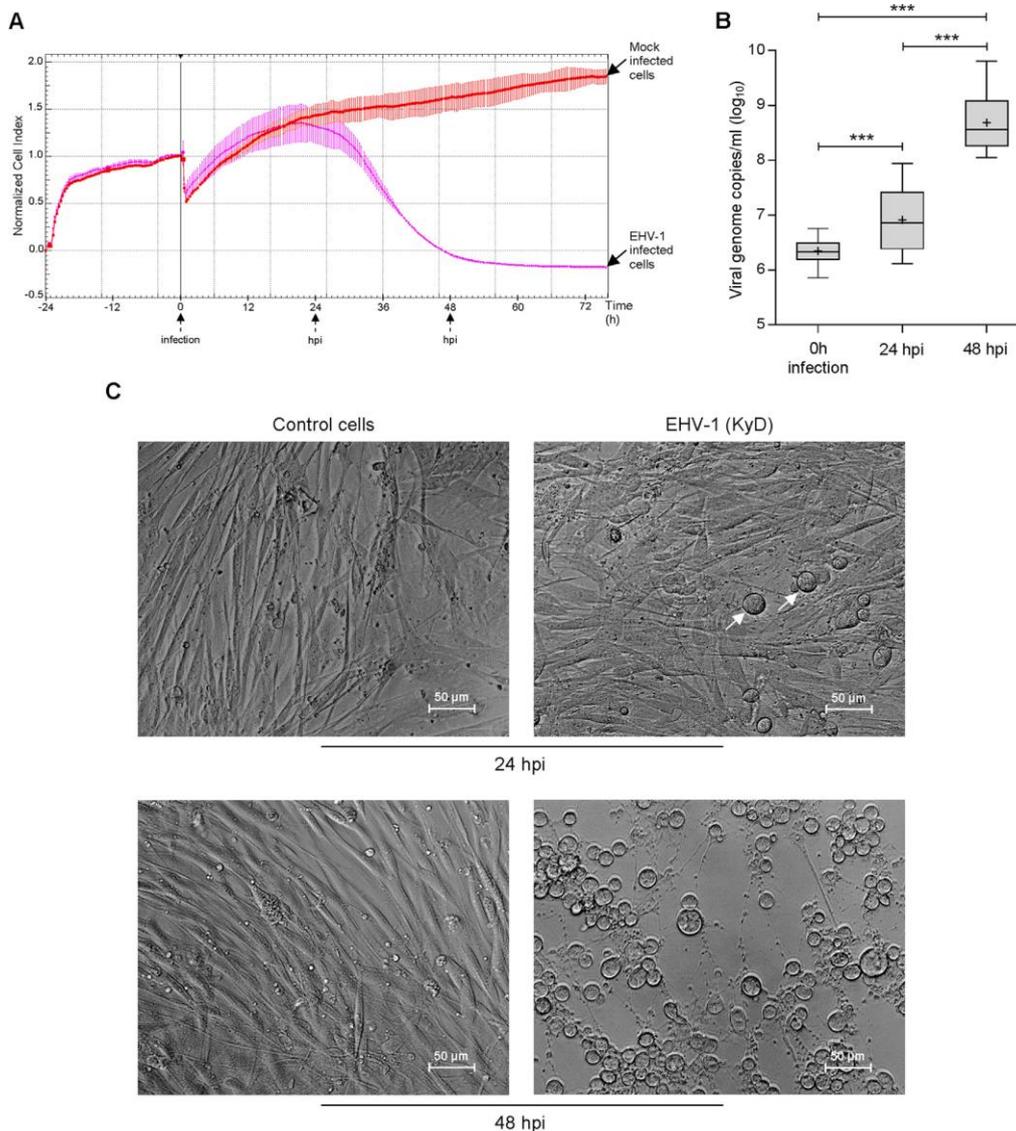
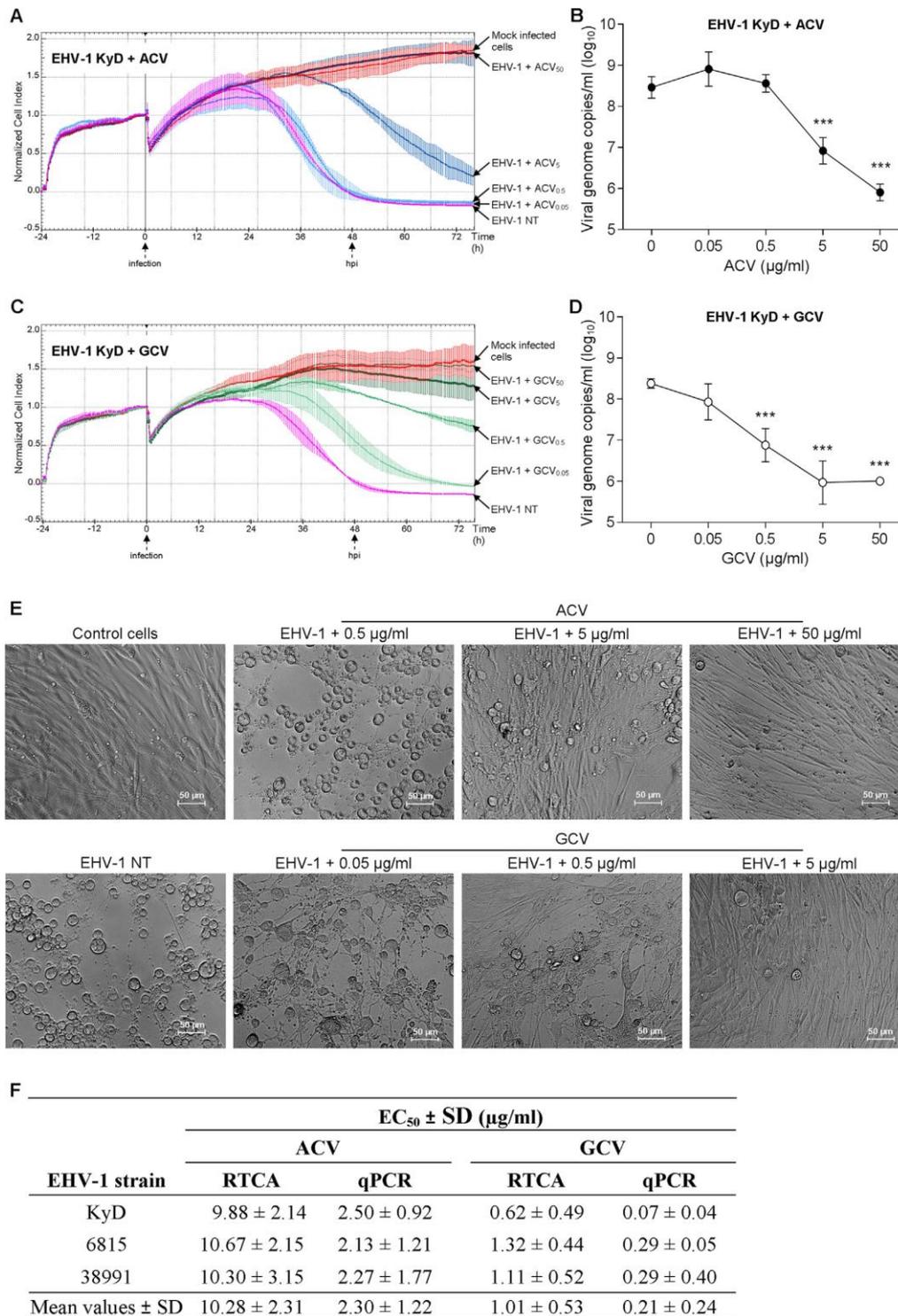


Fig. 1. Effect of EHV-1 KyD strain on E. Derm cells. (A) Real time monitoring of E. Derm cells proliferation and effect of CPE induced by EHV-1 measured by RTCA. The Cell Index values are normalised at the last time point before infection of cells (black vertical line). The red curve represents the CI_n of mock infected cells and purple curve represents the CI_n of EHV-1 infected cells. Each data point indicates the mean \pm SD of one assay in duplicate. Three independent experiments were performed. (B) Viral genome copies of EHV-1 measured by qPCR assays in the supernatant of infected cells collected at 0, 24 and 48 hpi. Box-plots represent the \log_{10} of viral genome copy numbers of twenty-two independent experiments (***: $P < 0.001$). (C) Microscopic observation of E. Derm cells infected or not by EHV-1 at 24 hpi and 48 hpi. White arrow indicates CPE.

3.3. Effect of aciclovir and ganciclovir against EHV-4 and EHV-3

The antiviral activity of ACV and GCV was tested on two other alphaherpesviruses: EHV-4 (strain 405/76) and EHV-3 (strain 1118). E. Derm cells were infected with EHV-4 (Fig. 3) or EHV-3 (Fig. 4) in the absence or presence of ACV or GCV, and the CI_n values were determined from 0 to 72 hpi. The CI_n values decreased upon EHV-4 infection, and both ACV and GCV showed cell protective effects (Fig. 3A and B). Antiviral effects were confirmed by quantification of viral genome copies at 48 hpi (Fig. 3C and D), in line with cell morphology profiles observed by microscopy (Fig. 3E). For EHV-4 infection, the EC_{50} values determined by RTCA were $17.38 \pm 5.95 \mu\text{g/ml}$ for ACV

and $2.79 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$ for GCV. When determined by qPCR, the EC_{50} values for ACV and GCV against EHV-4 were $2.83 \pm 1.80 \mu\text{g/ml}$ and $0.36 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$, respectively. Similar results were obtained with EHV-3 (Fig. 4A-E). The EC_{50} values determined by RTCA for ACV and GCV (calculated by RTCA) were $15.23 \pm 2.85 \mu\text{g/ml}$ and $1.86 \pm 0.46 \mu\text{g/ml}$, respectively (Fig. 4A-B). When calculated by qPCR, the EC_{50} values for ACV and GCV against EHV-3 were $1.92 \pm 1.90 \mu\text{g/ml}$ and $0.55 \pm 0.20 \mu\text{g/ml}$, respectively (Fig. 4C-D). Again, results were supported by cell morphology profiles observed by microscopy (Fig. 4E).



(caption on next page)

Fig. 2. Effects of ACV and GCV on E. Derm cells infected by EHV-1 (KyD). Real time monitoring of E. Derm cells infected by EHV-1 and treated by ACV (A) and GCV (C) measured by RTCA. The Cell Index values are normalised at the last time point before infection of cells (black vertical line). The red curve represents the CI_n of mock infected cells and purple curve represents the CI_n of EHV-1 infected cells and untreated (NT). Blue and green shade curves represent the CI_n of EHV-1 infected cells and treated with ten-fold serial dilution of ACV and GCV (50–0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$), respectively. Each data point indicates the mean \pm SD of one assay in duplicate. Three independent experiments were performed. Viral genome copies of EHV-1 in the culture supernatant 48 hpi measured by qPCR assays after ACV (B) and GCV (D) treatments. Each point represents the mean \pm SD of the \log_{10} of viral genome copy numbers of three independent experiments (***: $P < 0.001$). NT: not treated. (E) Microscopic observation at 48 hpi of E. Derm cells infected or not by EHV-1 after ACV or GCV treatment. (F) Susceptibility of three different EHV-1 strains to antiviral compounds measured by RTCA and qPCR at 48 hpi. Results are the means \pm SD of four independent experiments. Mean values correspond to mean of twelve EC_{50} values. EC_{50} : 50% effective concentration; qPCR: quantitative PCR.

3.4. Real-time cell analysis screening of antiviral compounds against EHV-1

In order to evaluate the RTCA system for the high-throughput screening of antiviral molecules in a 96-well format, a set of 80 chemical compounds was prepared at the Institut Pasteur, and then tested in our laboratory against EHV-1 infection (KyD strain) under blind conditions. All compounds were screened at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ because this concentration fits the EC_{50} of ACV as determined above (Fig. 2F). Ganciclovir (wells E12 - F12) was used as a positive antiviral control, whereas brequinar (wells G12 - H12), which kills E. Derm cells at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, was used as a cytotoxicity control. Data were analysed according to the decision tree presented in Fig. 5A. For each well, the area under the normalised curve (AUC_n) is calculated in order to integrate all CI_n values acquired by RTCA from 0 to 120 hpi (Fig. 5B). AUC_n values were ranging from 174.12 \pm 12.20 for non-infected cells to 54.95 \pm 4.24 for EHV-1 infected cells, with GCV showing some protective effect as expected ($AUC_n = 150.68 \pm 4.23$) while brequinar showing cytotoxic effect ($AUC_n = 13.89 \pm 0.58$). The Z'-Factor calculated from AUC_n values was found to be 0.59. Analysis of the RTCA curves indicated that compared to infected control cells, CI_n values prematurely declined with nine compounds and were not considered as potential antiviral compounds against EHV-1. Based on the AUC_n results, coupled with the time required for the CI to decrease by 50% after virus infection (CIT_{50}), only two compounds (aciclovir (A07) and spironolactone (E09)) scored positive among the 71 remaining compounds and delayed the CIT_{50} by 36 h 06 min and 07 h 51 min, respectively. Viral growth and microscope observations were performed at 48 hpi and showed that spironolactone decreased by 1.4 \log_{10} the EHV-1 genome copies number at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 5C) and delayed EHV-1 induced CPE on E. Derm cells (Fig. 5D). The antiviral effect of spironolactone was confirmed by three independent experiments with two-fold serial dilutions (Fig. 6). The EC_{50} values for spironolactone against EHV-1 were 11.24 \pm 0.51 $\mu\text{g}/\text{ml}$ determined by RTCA and 4.06 \pm 1.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$ calculated by qPCR. Results were supported by cell morphology profiles observed by microscopy (Fig. 6).

4. Discussion

The main methods for identifying antivirals are end-point assays, such as cell viability measurement, using colorimetric assays and microscopic monitoring. These methods are usually time-consuming and may not be adapted to study the cytopathic effect induced by EHV-1 on E. Derm cells. In our study, EHV-1 did not induce a loss of viability at 48 hpi when measured by trypan blue staining assays or ATP quantification (Supplementary Fig. 1). In fact, infected cells change their morphology by rounding up, and while adhesion to the substrate is lost, cells remain metabolically active to replicate the virus. The absence of cleavage of Caspases 3/7 during the first 48 hpi is consistent with previous studies. Turowska et al. (2010) reported that EHV-1 infection induces alterations in the cytoskeleton but does not trigger apoptosis in E. Derm cells at 24 hpi. More recently, Scrochi et al. (2017) showed that EHV-1 down-regulates apoptosis in E. Derm cells, but the mechanism involved is not yet defined. As conventional methods are not adapted in our conditions, a new approach has been investigated. Monitoring of cells impedance using electric field was first established in the 1980s (Giaever and Keese, 1993, 1984). Since then, the use of this technology

in the field of virology clearly increased, as impedance measurement appears to be an effective tool to study CPE (Charretier et al., 2018; Fang et al., 2011; Marlina et al., 2015; Pennington and Van de Walle, 2017; Piret et al., 2016; Spiegel, 1993; Teng et al., 2013; Tian et al., 2012; Witkowski et al., 2010). In this study, RTCA was used for the first time to follow the formation of CPE induced by three equid alphaherpesvirus species on E. Derm cell cultures, to measure the activity of two conventional antiviral compounds against these three viruses, and finally to conduct a pilot screen of eighty chemical compounds against EHV-1.

Results reported here further support the use of RTCA to monitor in real-time the CPE formation induced by EHV-1 on E. Derm cells, in line with the previous report of Golke et al. (2012), but also extend the application of this technology to EHV-4 and EHV-3. Furthermore, we showed that antiviral effects of reference drugs could be precisely quantified using the RTCA technology. First of all, CI_n decrease was positively correlated with CPE formation, as characterised by morphological changes and detachment of the cells. Secondly, viral loads measured by qPCR were negatively correlated with CI_n values as assessed in EHV-1, EHV3 or EHV-4 infected cultures when treated with ACV or GCV. These results are also consistent with previous observations on herpes simplex virus 1 (Piret et al., 2016), and confirm the interest of RTCA for monitoring the infection of permissive cells with herpesviruses. A recent study has also used impedance as a read-out to monitor cellular infections by the felid herpesvirus type 1, but using the Electric Cell-substrate Impedance Sensing system (ECIS, Applied Biophysics; Pennington and Van de Walle, 2017). Although the ECIS and RTCA measurement systems present some differences, the impedance profiles obtained for uninfected and infected cells using the two systems are concordant. With the ECIS system, the users must determine the appropriate frequency to evaluate resistance, capacitance and impedance levels, while with the RTCA system, the impedance level is automatically determined.

Aciclovir and ganciclovir are first-line antiviral compounds for the treatment of herpes simplex viruses and human cytomegalovirus diseases, respectively (De Clercq, 2013; De Clercq and Li, 2016), and are both active against EHV-1, EHV-4 and EHV-3 *in vitro* (reviewed in Vissani et al., 2016). In this study, the multiplicity of infection was set for each EHV-1 strain in order to have 100% of infected cells at 48 hpi. MOIs of the two field isolates (FR-6815 and FR-38991) were similar, whereas the MOI of the KyD strain was approximately 25 times lower. The referent KyD strain was isolated more than five decades ago, and compared to field strains, seems very well adapted to cell culture, which probably explains that a lower MOI had to be used. According to EC_{50} data calculated for ACV and GCV, no difference in sensitivity was measured between the three EHV-1 strains studied here. Strain FR-38991 was isolated in a previous study during an EHM episode (Pronost et al., 2012) and possess the A_{2254} mutation in the ORF30 DNA polymerase gene, as the KyD reference strain, whereas strain FR-6815 more recently isolated from an abortion episode does not. This observation is consistent with a previous report using a plaque reduction assay (PRA) with six EHV-1 isolates (Garre et al., 2007). The EC_{50} measured by qPCR are similar to EC_{50} measured by PRA for both ACV and GCV on equine embryonic lung cells (Garre et al., 2007) and primary fetal horse kidney (Azab et al., 2010). In contrast, EC_{50} calculated by RTCA were approximately 10 times higher than EC_{50} calculated by qPCR. The main

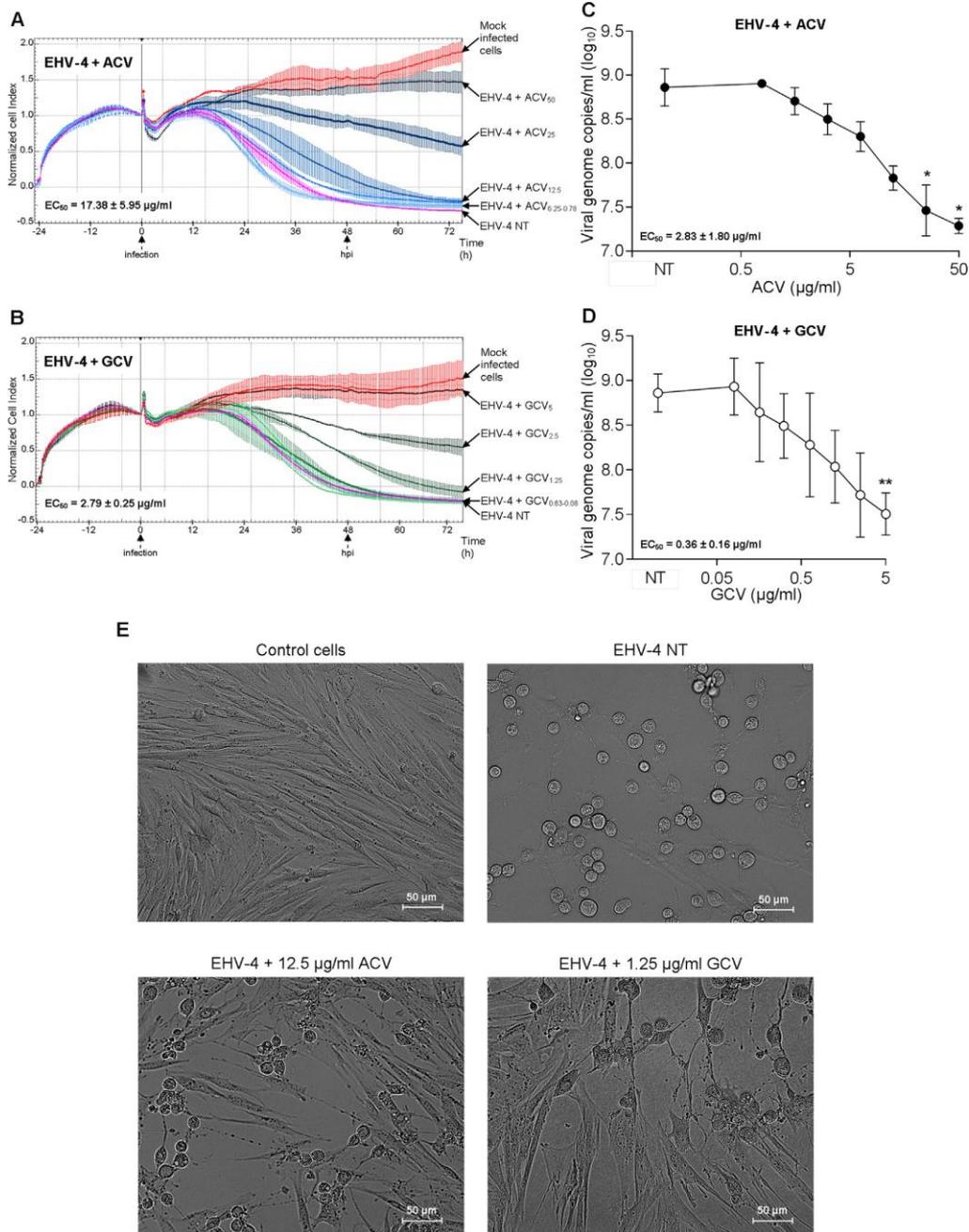


Fig. 3. Susceptibility of EHV-4 to ACV and GCV treatments measured by RTCA and qPCR. Real time monitoring of the susceptibilities of EHV-4 405/76 strain to ACV (A) and GCV (B) treatments on E. Derm cells. The Cell Index values are normalised at the last time point before infection of cells (black vertical line). The red curve represents the CI_n of mock infected cells and purple curve represent the CI_n of cells infected with EHV-4. Blue shade curves represent the CI_n of cells treated with two-fold serial dilution of ACV (50–0.78 µg/ml) and green shade curves represent the CI_n of cells treated with two-fold serial dilution of GCV (5–0.08 µg/ml) after infection by EHV-4. Each data point indicates the mean ± SD of one assay in duplicate. Three independent experiments were performed. The EC₅₀ were determined at 48 hpi for three independent experiments. Viral genome copies number of EHV-4 measured by qPCR at 48 hpi after treatment with different concentrations of ACV (C) and GCV (D). Each point represents the mean ± SD of the log₁₀ viral copy numbers of three independent experiments (*: P < 0.05, **: P < 0.01). (E) Microscopic observation at 48 hpi of E. Derm cells infected or not by EHV-4 after ACV (12.5 µg/ml) and GCV (1.25 µg/ml) treatment. NT: not treated.

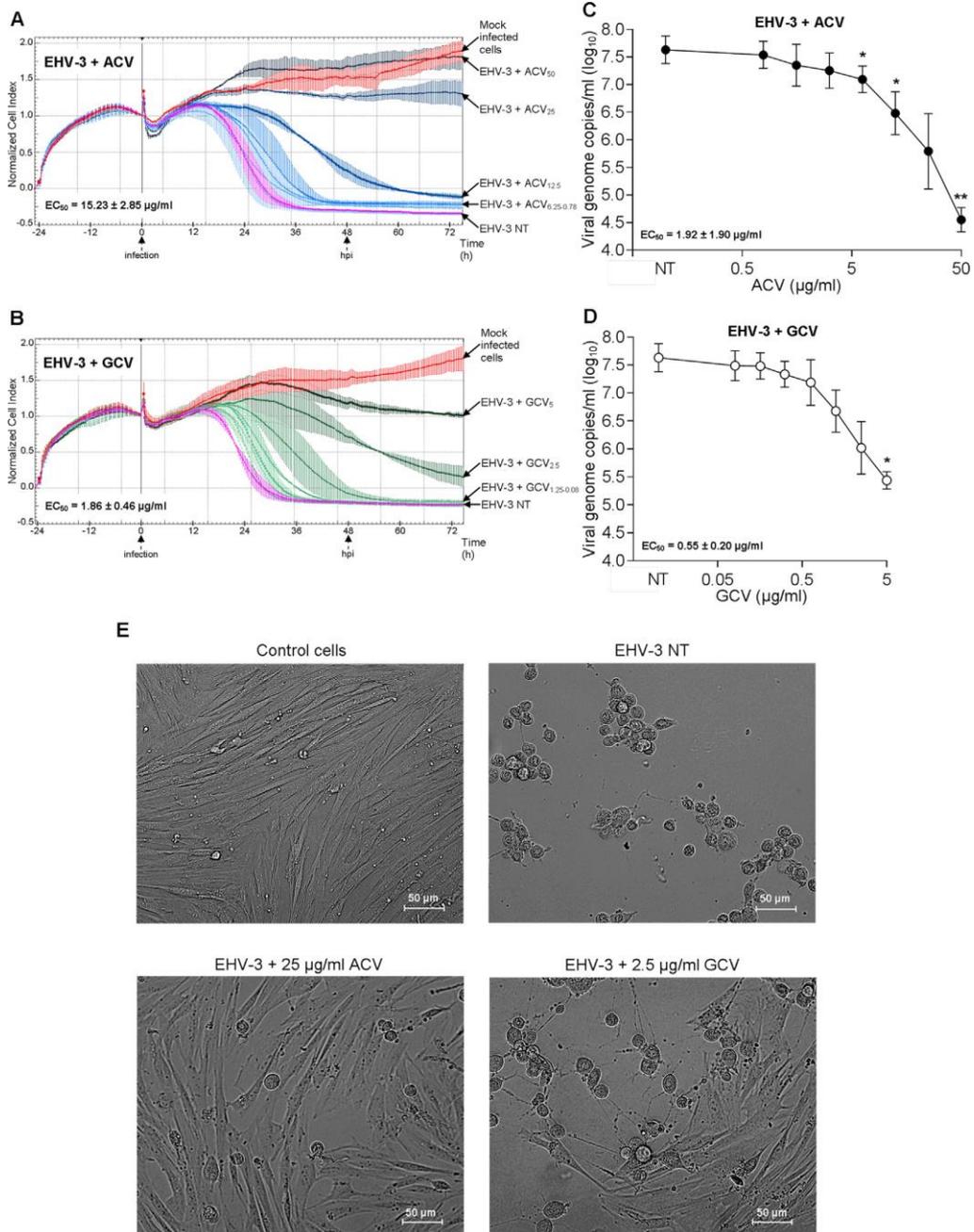
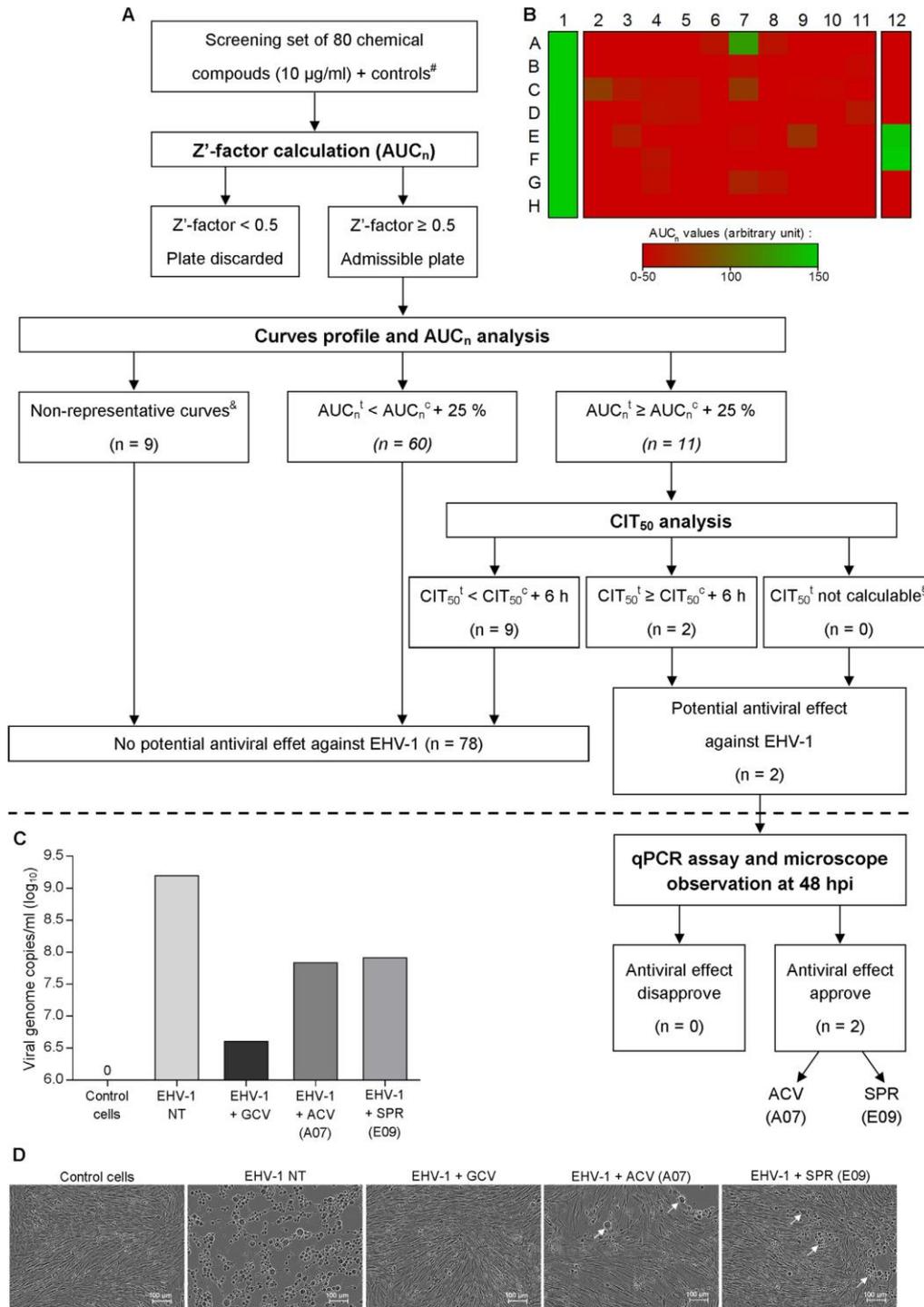


Fig. 4. Susceptibility of EHV-3 to ACV and GCV treatments measured by RTCA and qPCR. Real time monitoring of the susceptibilities of EHV-3 1118 strain to ACV (A) and GCV (B) treatments on E. Derm cells. The Cell Index values are normalised at the last time point before infection of cells (black vertical line). The red curve represents the CI_n of mock infected cells and purple curve represent the CI_n of cells infected with EHV-3. Blue shade curves represent the CI_n of cells treated with two-fold serial dilution of ACV (50–0.78 µg/ml) and green shade curves represent the CI_n of cells treated with two-fold serial dilution of GCV (5–0.08 µg/ml) after infection by EHV-3. Each data point indicates the mean ± SD of one assay in duplicate. Three independent experiments were performed. The EC₅₀ were determined at 48 hpi for three independent experiments. Viral genome copies number of EHV-3 measured by qPCR at 48 hpi after treatment with different concentrations of ACV (C) and GCV (D). Each point represents the mean ± SD of the log₁₀ viral copy numbers of three independent experiments (*: P < 0.05, **: P < 0.01). (E) Microscopic observation at 48 hpi of E. Derm cells infected or not by EHV-4 after ACV (25 µg/ml) and GCV (2.5 µg/ml) treatment. NT: not treated.



(caption on next page)

reason to explain the variation in EC₅₀ could be related to the different readouts of these techniques (*i.e.* cellular adherence level measured by RTCA versus genome copies numbers measured by qPCR). Although the anti-EHV-1 effects of ACV and GCV were clearly demonstrated, results

show that GCV was the most effective against all three EHV-1 strains compared to ACV. Indeed, GCV was between 10 and 20-times more effective than ACV against EHV-1. Our results confirm previous studies where GCV was found to be 12 times (Garre et al., 2007) and 27 times

Fig. 5. Analysis of one chemical library screening in 96-well format. (A) Decision tree for data analysis from chemical library screening in 96-well format using RTCA. 80 compounds were tested (columns 2–11). Columns 1 and 12 are devoted to controls, which are used to determine the Z'-factor calculated from the area under normalised curves (AUC_n) values between 0 hpi and 120 hpi. AUC_n^t is the area under normalised curves of treated cells, AUC_n^c is the area under normalised curves of untreated control cells, CIT_{50}^t is the time required to the CI_n of treated cells to decrease 50% after virus infection and CIT_{50}^c is the time required to the CI_n of untreated control cells to decrease 50% after virus infection. [#] Controls correspond to infected/uninfected cells with or without DMSO, infected cells with 5 $\mu\text{g/ml}$ GCV and uninfected cells with 50 $\mu\text{g/ml}$ brequinar. ^{*} Non-representative curves: curves with a decline of CI_n values that appear prior CPE formation (example: brequinar at 50 $\mu\text{g/ml}$). [§] CIT_{50}^t not calculable: treatments prevent the CI_n decrease (example: ganciclovir at 5 $\mu\text{g/ml}$). Dashed line separates the screening step from the validation step. (B) Heat map representation of the plate from the Prestwick Chemical Library[®] (80 compounds) screened at 10 $\mu\text{g/ml}$ under blind conditions. AUC_n corresponds to the area under curves calculations after CI normalisation between 0 hpi and 120 hpi. Column 1 corresponds to uninfected control cells either untreated (wells A1 - D1) or treated with DMSO (wells E1 - H1), and column 12 corresponds to infected cells (wells A12 - B12), infected cells with DMSO (wells C12 - D12), infected cells with 5 $\mu\text{g/ml}$ GCV as positive antiviral control (wells E12 - F12) and uninfected cells with 50 $\mu\text{g/ml}$ brequinar as a toxicity control (wells G12 - H12). (C) Viral genome copies number of EHV-1 measured by qPCR at 48 hpi after treatment with 5 $\mu\text{g/ml}$ of GCV, 10 $\mu\text{g/ml}$ of ACV and 10 $\mu\text{g/ml}$ of spironolactone (SPR). Each bar represents the \log_{10} viral copy numbers of a single experiment. (D) Microscopic observation at 48 hpi of E. Derm cells infected or not by EHV-1 after GCV (5 $\mu\text{g/ml}$), ACV (10 $\mu\text{g/ml}$) and SPR (10 $\mu\text{g/ml}$) treatments. White arrow indicates CPE induced by EHV-1. NT: not treated.

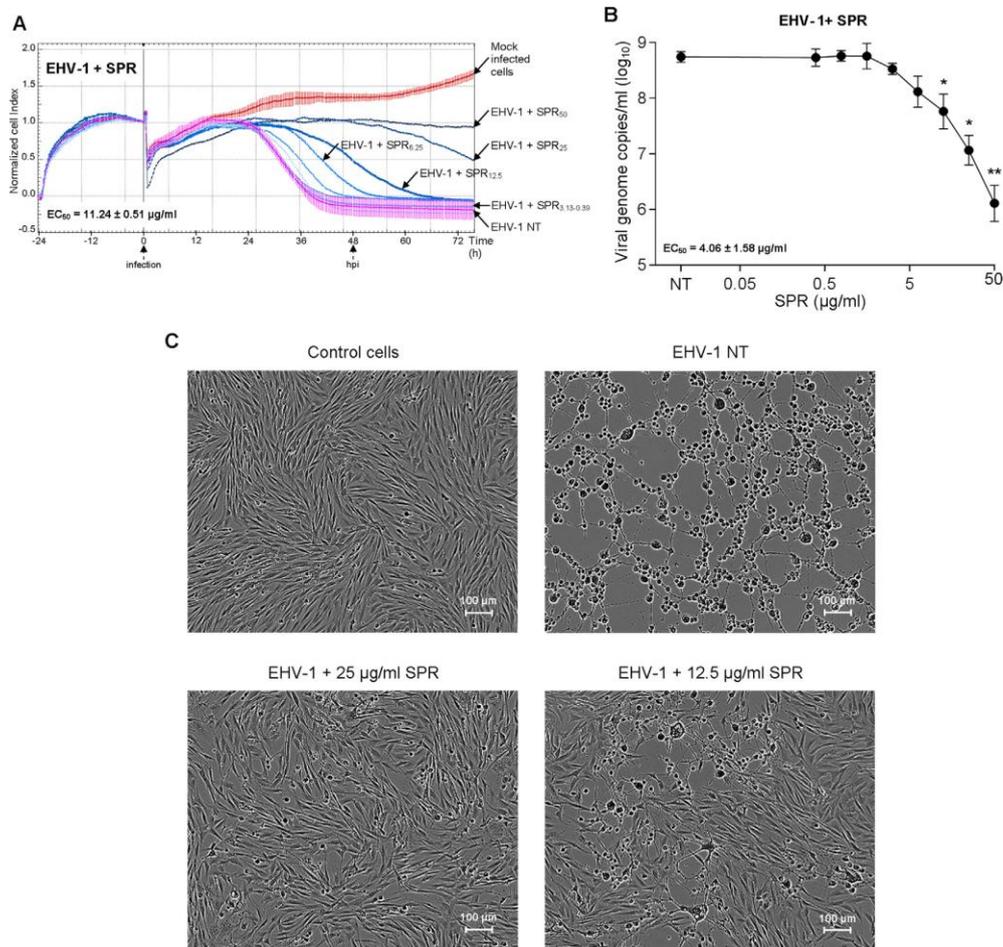


Fig. 6. Susceptibility of EHV-1 to spironolactone treatment measured by RTCA and qPCR. (A) Real time monitoring of the susceptibility of EHV-1 KyD strain to spironolactone (SPR) treatment on E. Derm cells. The Cell Index values are normalised at the last time point before infection of cells (black vertical line). The red curve represents the CI_n of mock infected cells and purple curve represent the CI_n of cells infected with EHV-1. Blue shade curves represent the CI_n of cells treated with two-fold serial dilution of SPR (50–0.39 $\mu\text{g/ml}$) after infection by EHV-1. The EC_{50} were determined at 48 hpi for three independent experiments. (B) Viral genome copies number of EHV-1 measured by qPCR at 48 hpi after treatment with different concentrations of SPR. Each point represents the mean \pm SD of the \log_{10} viral copy numbers of three independent experiments (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$). (C) Microscopic observation at 48 hpi of E. Derm cells infected or not by EHV-1 after SPR (25 $\mu\text{g/ml}$ and 12.5 $\mu\text{g/ml}$) treatment. NT: not treated.

(Azab et al., 2010) more effective than ACV in PRA, which supports the use of RTCA for antiviral studies.

Although several studies have evaluated the effectiveness of ACV and GCV against EHV-1 *in vitro*, there are only few available data concerning their activities against EHV-4 or EHV-3. Using RTCA, we have demonstrated that EHV-4 is sensitive to ACV and GCV. Although, EHV-4 is closely related to EHV-1, it appears slightly less sensitive to these antiviral compounds. Our data are consistent with the previous report by (Azab et al., 2010) showing an EC₅₀ value higher than 50 µg/ml for the TH20p strain after ACV treatment. Concerning EHV-3, the EC₅₀ of ACV treatment obtained by RTCA is consistent with the one obtained by PRA in the same cellular model (15.74 ± 4.48 µg/ml; Vissani et al., 2018). Our results also confirm that EHV-3 is more sensitive to GCV than ACV, although the EC₅₀ of GCV obtained by RTCA was 10 times higher compared to PRA (Vissani et al., 2018). Based on these results, GCV is the best antiviral compound against these three alphaherpesviruses *in vitro* and appears promising for *in vivo* experiments.

As it is allowing the independent monitoring of 6 × 96-well plates, the RTCA MP instrument is adapted to conduct functional screenings for antiviral compound discovery, saving significant time and energy, when compared with other methods. RTCA automatically accumulates strong kinetic data requiring the calculation of appropriate parameters. In this study, a pilot screen of eighty compounds on one 96-well plate was conducted against EHV-1. Fig. 5 presents our decisional tree to interpreting the screening data using RTCA system. The Z'-factor is a useful tool to determine the quality of high-throughput screening (Zhang et al., 1999). Based on AUC_n results, the Z'-Factor value was found above 0.5, which proves the high robustness of this assay. The AUC_n calculation coupled to curves analysis and CIT₅₀ determination allow highly sensitive analyses of RTCA screening results. Indeed, our system was effective to pinpoint ACV among eighty compounds under blind conditions and discovered spironolactone as a new potential inhibitor of EHV-1. The effect of spironolactone was confirmed by dose-response assays against EHV-1, but also EHV-4 and EHV-3 (data not shown). These results suggest that this molecule could inhibit different *Herpesviridae*. Interestingly, Verma et al. (2016) had recently reported that spironolactone reduced the production of Epstein-Barr virus, a major human *Herpesviridae*, by targeting the SM protein. The antiviral effect of spironolactone was also reported in RNA viruses (HIV-1 and HIV-2; Lacombe et al., 2016). Spironolactone is a mineralocorticoid antagonist and potassium-sparing diuretic, used in the treatment of high blood pressure, heart failure and dropsy (Chapman et al., 2007; Pitt and Perez, 1999). It is also an androgen signalling inhibitor frequently used in the treatment of various dermatological conditions that involve testosterone (Trivedi et al., 2017). This demonstrates the interest of RTCA for the phenotypic screening of chemical libraries to identify antivirals.

In summary, this study confirms the efficiency of RTCA to monitor CPE formation induced by EHV-1 on E. Derm cells, and further extends this tool to EHV-4 and EHV-3. It is also the first evaluation and comparison of antiviral compounds against equid alpha-herpesviruses using a unique cell line and a normalised assay. In this model, GCV was found more effective than ACV against all viruses used to infect E. Derm cells. Furthermore, this label-free technology was proven suitable for the high-throughput screening of antiviral compounds, and allowed the identification of spironolactone as a novel inhibitor of EHV-1. In conclusion, RTCA technology is a promising and powerful tool allowing to complement and support conventional methods used in the field of equine virology.

Acknowledgments

This work was supported by LABÉO, IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation, project AMIE), Fonds Eperon (project N87-2014, N07-2015, N07-2016 and N13-2017) and Région Normandie

(CPER R25 P3).

Conflict of interest

The authors declare no competing interests.

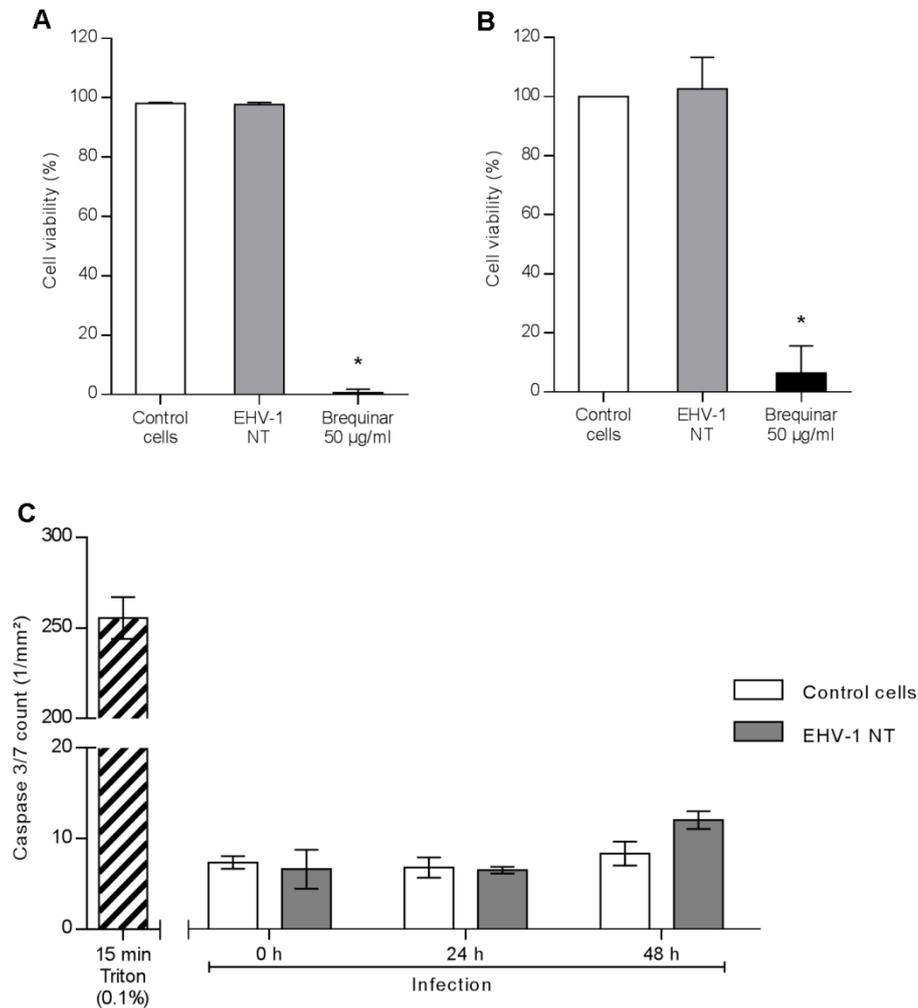
Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.virol.2018.10.013

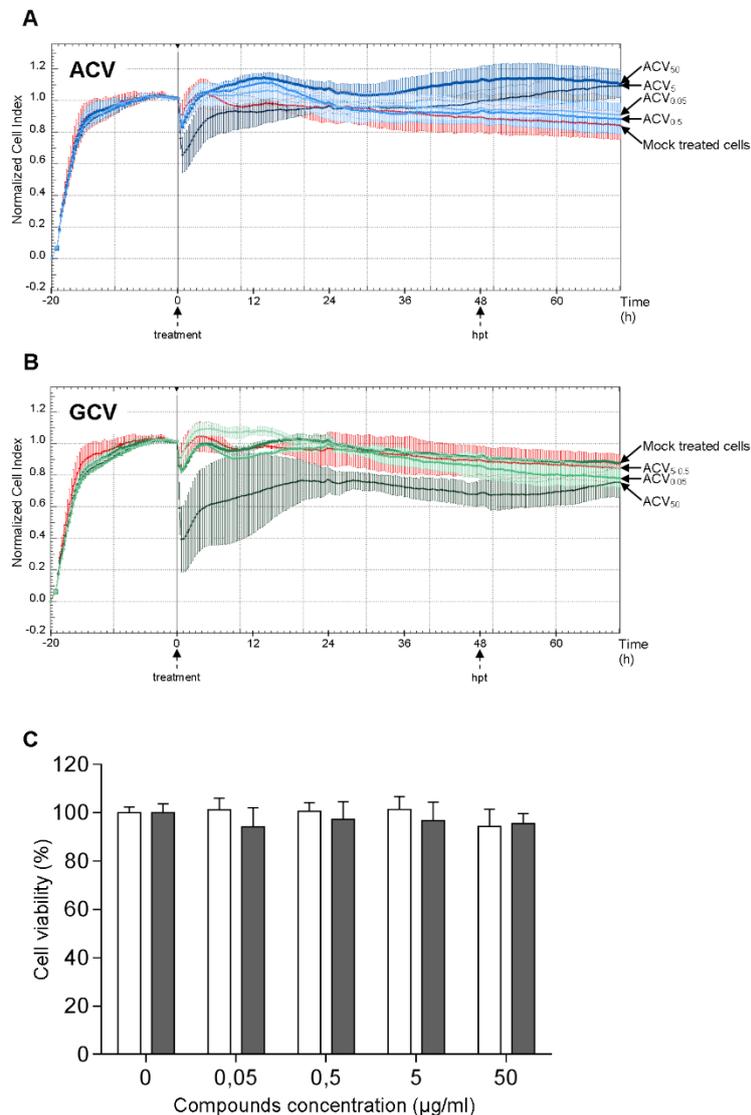
References

- Azab, W., Tsujimura, K., Kato, K., Arai, J., Morimoto, T., Kawaguchi, Y., Tohya, Y., Matsumura, T., Akashi, H., 2010. Characterization of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 4 and *in vitro* susceptibility of the virus to antiviral agents. *Antivir. Res.* 85, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.007>.
- Barbić, L., Lojkić, I., Stevanović, V., Bedeković, T., Starešina, V., Lemo, N., Lojkić, M., Madić, J., 2012. Two outbreaks of neuropathogenic equine herpesvirus type 1 with breed-dependent clinical signs. *Vet. Rec.* 170 <https://doi.org/10.1136/vr.100150>. (227–227).
- Barrandeguy, M., Thiry, E., 2012. Equine coital exanthema and its potential economic implications for the equine industry. *Vet. J.* 191, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.01.016>.
- Carmichael, R.J., Whitfield, C., Maxwell, L.K., 2013. Pharmacokinetics of ganciclovir and valganciclovir in the adult horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 36, 441–449. <https://doi.org/10.1111/jvp.12029>.
- Chapman, N., Dobson, J., Wilson, S., Dahlof, B., Sever, P.S., Wedel, H., Poulter, N.R., on behalf of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial Investigators, 2007. Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension. *Hypertension* 49, 839–845. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000259805.18468.8c>.
- Charretier, C., Saulnier, A., Benair, L., Armanet, C., Bassard, I., Daulon, S., Bernigaud, B., Rodrigues de Sousa, E., Gonther, C., Zorn, E., Vetter, E., Saintpierre, C., Riou, P., Gaillac, D., 2018. Robust real-time cell analysis method for determining viral infectious titers during development of a viral vaccine production process. *J. Virol. Methods* 252, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.11.002>.
- Cooper, M.A., 2006. Non-optical screening platforms: the next wave in label-free screening? *Drug Discov. Today* 11, 1068–1074. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.10.001>.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171–177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>.
- De Clercq, E., 2013. Antivirals: past, present and future. *Biochem. Pharmacol.* 85, 727–744. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.011>.
- De Clercq, E., Li, G., 2016. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>.
- Diallo, I.S., Hewitson, G., Wright, L., Rodwell, B.J., Corney, B.G., 2006. Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 131, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.010>.
- Diallo, I.S., Hewitson, G., Wright, L.L., Kelly, M.A., Rodwell, B.J., Corney, B.G., 2007. Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet. Microbiol.* 123, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.004>.
- Fang, Y., Ye, P., Wang, X., Xu, X., Reisen, W., 2011. Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *J. Virol. Methods* 173, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.013>.
- Friday, P.A., Scarratt, W.K., Elvinger, F., Timoney, P.J., Bonda, A., 2000. Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 197–201.
- Garre, B., Gryspeerdt, A., Croubels, S., De Backer, P., Nauwynck, H., 2009. Evaluation of orally administered valacyclovir in experimentally EHV1-infected ponies. *Vet. Microbiol.* 135, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.062>.
- Garre, B., Vandermeulen, K., Nugent, J., Neyts, J., Croubels, S., Debacker, P., Nauwynck, H., 2007. *In vitro* susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. *Vet. Microbiol.* 122, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.004>.
- Giaever, I., Keese, C.R., 1993. A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 366, 591–592.
- Giaever, I., Keese, C.R., 1984. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3761–3764.
- Goehring, L.S., Winden, S.C., Maanen, C. van, Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S., 2006. Equine herpesvirus type 1-associated myelencephalopathy in the Netherlands: a four-year retrospective study (1999–2003). *J. Vet. Intern. Med.* 20, 601–607.
- Golke, A., Cymerys, J., Słoińska, A., Dzieciatkowski, T., Chmielewska, A., Tucholska, A., Bańbura, M., 2012. The xCELLigence system for real-time and label-free analysis of neuronal and dermal cell response to Equine Herpesvirus type 1 infection. *Pol. J. Vet. Sci.* 15. <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0126-4>.
- Goodman, L., Wagner, B., Flaminio, M., Sussman, K., Metzger, S., Holland, R., Osterrieder, N., 2006. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Vaccine* 24, 3636–3645. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.01.062>.

- Henninger, R.W., Reed, S.M., Saville, W.J., Allen, G.P., Hass, G.F., Kohn, C.W., Sofaly, C., 2007. Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 157–165.
- Hue, E.S., Fortier, C.I., Laurent, A.M., Quesnelle, Y.F., Fortier, G.D., Legrand, L.J., Pronost, S.L., 2016. Development and validation of a quantitative PCR method for equid herpesvirus-2 diagnostics in respiratory fluids. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/53672>.
- Kydd, J.H., Slater, J., Osterrieder, N., Lunn, D.P., Antczak, D.F., Azab, W., Balasuriya, U., Barnett, C., Brosnahan, M., Cook, C., Damiani, A., Elton, D., Frampton, A., Gilkerson, J., Goehring, L., Horohov, D., Maxwell, L., Minke, J., Morley, P., Nauwynck, H., Newton, R., Perkins, G., Pusterla, N., Soboll-Hussey, G., Traub-Dargatz, J., Townsend, H., Van de walle, G.R., Wagner, B., 2012. Third international havemeyer workshop on equine herpesvirus type 1: EHV-1 havemeyer workshop report. *Equine Vet. J.* 44, 513–517. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00604.x>.
- Lacombe, B., Morel, M., Margottin-Goguet, F., Ramirez, B.C., 2016. Specific inhibition of HIV infection by the action of spironolactone in T cells. *J. Virol.* 90, 10972–10980. <https://doi.org/10.1128/JVI.01722-16>.
- Léon, A., Fortier, G., Fortier, C., Freymuth, F., Tapprest, J., Leclercq, R., Pronost, S., 2008. Detection of equine herpesviruses in aborted fetuses by consensus PCR. *Vet. Microbiol.* 126, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.019>.
- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Franssen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., Pauwels, P., 2012. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* 7, e46536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046536>.
- Lucas-Hourani, M., Munier-Lehmann, H., Helynck, O., Komarova, A., Desprès, P., Tangy, F., Vidalain, P.-O., 2014. High-throughput screening for broad-spectrum chemical inhibitors of RNA viruses. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/51222>.
- Lunn, D.P., Davis-Poynter, N., Flaminio, M.J.B.F., Horohov, D.W., Osterrieder, K., Pusterla, N., Townsend, H.G.G., 2009. Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 450–461. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x>.
- Marlina, S., Shu, M.-H., AbuBakar, S., Zandi, K., 2015. Development of a Real-Time Cell Analysing (RTCA) method as a fast and accurate screen for the selection of chikungunya virus replication inhibitors. *Parasit. Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1104-y>.
- Mori, E., Borges, A.S., Delfino, D.J.Z., Oliveira Filho, J.P., de, Goncalves, R.C., Cagnini, D.Q., Lara, M., Cunha, E.M.S., Villalobos, E.M.C., Nassar, A.F.C., et al., 2011. First detection of the equine herpesvirus 1 neuropathogenic variant in Brazil. *Rev. Sci. Tech. -OIE* 30, 949.
- Noah, J.W., Severson, W., Noah, D.L., Rasmussen, L., White, E.L., Jonsson, C.B., 2007. A cell-based luminescence assay is effective for high-throughput screening of potential influenza antivirals. *Antivir. Res.* 73, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.07.006>.
- Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K.C., Mumford, J.A., Swann, Z., Newton, J.R., Bowden, R.J., Allen, G.P., Davis-Poynter, N., 2006. Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J. Virol.* 80, 4047–4060. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006>.
- Paillot, R., Case, R., Ross, J., Newton, R., Nugent, J., 2008. Equine herpes virus-1: virus, immunity and vaccines. *Open Vet. Sci. J.* 2.
- Pan, T., Huang, B., Zhang, W., Gabos, S., Huang, D.Y., Devendran, V., 2013. Cytotoxicity assessment based on the AUC50 using multi-concentration time-dependent cellular response curves. *Anal. Chim. Acta* 764, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.047>.
- Patel, J.R., Heldens, J., 2005. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunopathogenesis: a brief review. *Vet. J.* 170, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.04.018>.
- Pennington, M.R., Van de Walle, G.R., 2017. Electric cell-substrate impedance sensing to monitor viral growth and study cellular responses to infection with alpha-herpesviruses in real time. *mSphere* 2, e00039–17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00039-17>.
- Piret, J., Goyette, N., Boivin, G., 2016. Novel method based on real-time cell analysis for drug susceptibility testing of herpes simplex virus and human cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2120–2127. <https://doi.org/10.1128/JCM.03274-15>.
- Pitt, B., Perez, A., 1999. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N. Engl. J. Med.* 9.
- Pronost, S., Legrand, L., Pitel, P.-H., Wegge, B., Lissens, J., Freymuth, F., Richard, E., Fortier, G., 2012. Outbreak of equine herpesvirus myeloencephalopathy in France: a clinical and molecular investigation: outbreak of EHV-1 myeloencephalopathy. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 256–263. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01263.x>.
- Pronost, S., Léon, A., Legrand, L., Fortier, C., Miszczak, F., Freymuth, F., Fortier, G., 2010. Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Vet. Microbiol.* 145, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.031>.
- Pusterla, N., Hussey, G.S., 2014. Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 30, 489–506. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.006>.
- Scrochi, M., Zanuzzi, C., Fuentealba, N., Nishida, F., Bravi, M., Pacheco, M., Sguazza, G., Gimeno, E., Portiansky, E., Muglia, C., Galosi, C., Barbeito, C., 2017. Investigation of apoptosis in cultured cells infected with equine herpesvirus 1. *Biotech. Biochem. Technol.* 2, 363–372. <https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1359749>.
- Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B., Zheng, W., 2004. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev. Technol.* 2, 363–372.
- Spiegel, M., 1993. Real-time and label-free monitoring of virus-mediated cytopathogenicity. *Nature* 366.
- Sudo, K., Konno, K., Yokota, T., Shigetani, S., 1995. A screening system for antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 using the MTT method with L929 cells. *Tohoku J. Exp. Med.* 176, 163–171.
- Teng, Z., Kuang, X., Wang, J., Zhang, X., 2013. Real-time cell analysis – a new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *J. Virol. Methods* 193, 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.034>.
- Tian, D., Zhang, W., He, J., Liu, Y., Song, Z., Zhou, Z., Zheng, M., Hu, Y., 2012. Novel, real-time cell analysis for measuring viral cytopathogenesis and the efficacy of neutralizing antibodies to the 2009 influenza A (H1N1) virus. *PLoS One* 7, e31965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031965>.
- Traub-Dargatz, J.L., Pelzel-McCluskey, A.M., Creekmore, L.H., Geiser-Novotny, S., Kasari, T.R., Wiedenheft, A.M., Bush, E.J., Bjork, K.E., 2013. Case-control study of a multi-state equine herpesvirus myeloencephalopathy outbreak. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 339–346. <https://doi.org/10.1111/jvim.12051>.
- Trivedi, M.K., Shinkai, K., Murase, J.E., 2017. A Review of hormone-based therapies to treat adult acne vulgaris in women. *Int. J. Women's Dermatol.* 3, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2017.02.018>.
- Turowska, A., Pajak, B., Godlewski, M.M., Dzieciatkowski, T., Chmielewska, A., Tucholska, A., Banbura, M., 2010. Opposite effects of two different strains of equine herpesvirus 1 infection on cytoskeleton composition in equine dermal ED and African green monkey kidney Vero cell lines: application of scanning cytometry and confocal-microscopy-based image analysis in a quantitative study. *Arch. Virol.* 155, 733–743. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0622-3>.
- Verma, D., Thompson, J., Swaminathan, S., 2016. Spironolactone blocks Epstein-Barr virus production by inhibiting EBV SM protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 3609–3614. <https://doi.org/10.1016/j.pnas.2016.06.010>.
- Vissani, M.A., Thiry, E., Dal Pozzo, F., Barrandeguy, M., 2016. Antiviral agents against equid alphaherpesviruses: current status and perspectives. *Vet. J.* 207, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.010>.
- Vissani, M.A., Zabal, O., Tordoya, M.S., Parreño, V., Thiry, E., Barrandeguy, M., 2018. In vitro comparison of acyclovir, ganciclovir and cidofovir against equid alphaherpesvirus 3 and evaluation of their efficacy against six field isolates. *Rev. Argent. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.003>.
- Witkowski, P.T., Schuenadel, L., Wiethaus, J., Bourquain, D.R., Kurth, A., Nitsche, A., 2010. Cellular impedance measurement as a new tool for poxvirus titration, antibody neutralization testing and evaluation of antiviral substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.003>.
- Zhang, J.-H., Chung, T.D.Y., Oldenburg Kevin, R., 1999. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* 4, 67–73.



Supplementary figure 1: Cytotoxicity assay of EHV-1 on equine dermal cells. Toxicity evaluation of EHV-1 KyD on E. Derm cells measured by trypan blue exclusion test and luminescence assays. **(A)** Cell viability measured at 48 hpt by trypan blue exclusion assays. Histogram represents the percentage viability of control cells (white), infected cells with EHV-1 KyD (grey) and cells treated with brequinar at 50 µg/ml (black) as toxicity control. Data correspond to means ± SD of four independent experiments. Statistical analyses were performed using appropriate ANOVA, with Dunn post hoc test (*: $P < 0.05$). **(B)** Cell viability was measured at 48 hpt using CellTiter Glo® kit. Histogram represents the percentage of viability of control cells (white), infected cells with EHV-1 KyD (grey) and cells treated with brequinar at 50 µg/ml (black) as toxicity control. Each data corresponds to mean ± SD of three independent experiments done in duplicate (*: $P < 0.05$). **(C)** Cleavage of Caspase 3/7 was measured at 0 h, 24 h and 48 h after EHV-1 KyD infection. Triton (0.1 %) was used as a positive control for inducing apoptosis in E. Derm cells (15 min). NT: not treated.



Supplementary figure 2: Cytotoxicity assay of aciclovir and ganciclovir on equine dermal cells. Toxicity evaluation of ACV and GCV on E. Derm cells measured by RTCA and luminescence assays. Real time monitoring of E. Derm cells proliferation with increasing concentration of ACV (**A**) and GCV (**B**). The Cell Index values are normalised at the last time point before infection of cells (black vertical line). The red curve represents the CI_n of controls cells. The blue and green shade curves represent the CI_n of cells treated with ten-fold serial dilution of ACV and GCV (50 to 0.05 µg/ml). Each data point indicates the mean \pm SD of one assay in duplicate. Three independent experiments were performed. (**C**) Cell viability was measured at 48 hpt using CellTiter Glo® kit. Histogram represents the percentage viability of E. Derm cells treated with increase concentration of ACV (white bars) and GCV (grey bars), compared to mock-treated cells. Each data corresponds to mean \pm SD of three independent experiments done in duplicate.

1.3. Résultats et discussion

Lors de cette étude, la preuve de concept de l'utilisation de l'appareil xCELLigence® pour suivre en temps réel l'effet de molécules antivirales contre l'HVE-1 a été réalisée.

Dans un premier temps, la capacité de l'appareil xCELLigence® pour suivre la formation d'ECP induits par la souche d'HVE-1 Kentucky (KyD) sur cellules ED a été mesurée en parallèle par impédancemétrie et microscopie. Tout d'abord, le CI amorce sa chute lorsque les premiers ECP, caractérisés par un arrondissement et un décollement des cellules, apparaissent. Parallèlement, nous avons observé que les cellules ED infectées par l'HVE-1 ne présentaient pas de perte de viabilité à l'aide de tests de viabilité cellulaire (Bleu Trypan et mesure d'ATP cellulaire avec le kit CellTiter-Glo®). Dans un second temps, lorsque le tapis cellulaire est complètement décollé, le CI atteint une valeur nulle. Enfin, comme la technologie RTCA xCELLigence® n'est pas une méthode spécifique, les résultats obtenus ont été confirmés par quantification des charges virales par qPCR. Ces résultats montrent une augmentation significative du nombre de copies d'HVE-1 produites dans le surnageant au cours du temps. L'ensemble de ces données nous permet de confirmer que la chute du CI observée est bien induite par l'infection des cellules ED par l'HVE-1.

Dans un second temps, nous avons investigué l'effet antiviral de l'aciclovir (ACV) et du ganciclovir (GCV) par mesure de l'impédance cellulaire avec l'xCELLigence® et par quantification des charges virales par qPCR. Ces deux molécules antivirales ont réduit significativement et de manière dose-dépendante les charges virales d'HVE-1. Nous avons observé une corrélation entre les résultats obtenus par qPCR et les résultats d'impédancemétrie obtenus par mesure sur xCELLigence®. Néanmoins, les concentrations efficaces médianes (EC₅₀) mesurées avec l'appareil RTCA xCELLigence® diffèrent de celles mesurées par qPCR. Une corrélation entre ces résultats sera objectivée dans la suite de l'étude (Figure 1 article 2). Le GCV s'est avéré être 10 fois plus efficace que l'ACV quelle que soit la méthode utilisée. Ces résultats ont également pu être montrés pour deux autres alphaherpèsvirus équins, l'HVE-4 et l'HVE-3. Par ailleurs l'ACV et le GCV n'ont pas montré de différence d'efficacité entre les différentes souches d'HVE-1 (A₂₂₅₄ et G₂₂₅₄) utilisées. Ces résultats suggèrent que la mutation en position 2254 de l'ADN polymérase virale n'altère pas l'effet de ces molécules antivirales.

Enfin, l'efficacité de cette technologie pour cribler un grand nombre de molécules antivirales contre l'HVE-1 en format 96 puits a été évaluée. Le calcul du Z'-factor a permis de valider de façon standardisée la qualité du criblage à partir des valeurs d'aires sous la courbe (AUC) obtenues pour les contrôles sur chaque plaque. Nous avons défini un arbre décisionnel basé sur le calcul d'AUC et du temps requis pour réduire le CI de 50% après infection (CIT₅₀) pour sélectionner les molécules efficaces. Une plaque contenant 80 composés provenant de la chimiothèque Prestwick® a été testée à l'aveugle avec notre modèle d'étude et les résultats ont été analysés à l'aide de cet arbre décisionnel. Parmi les 80 molécules testées à 10 mg/mL, deux hits ont été identifiés : l'ACV et la spironolactone. Le fait de sélectionner l'ACV, molécule antivirale de référence, nous a permis de confirmer la puissance de l'appareil RTCA xCELLigence® et de notre arbre décisionnel pour le criblage de molécules. Il s'agissait de la première description de la spironolactone comme molécule anti-herpétique à notre connaissance. Son effet antiviral contre l'HVE-1 a été confirmé par dose-réponse et présente une efficacité comparable à celle de l'ACV sur notre modèle cellulaire.

Cette étude a permis de démontrer la capacité de l'xCELLigence® à i) suivre l'apparition d'ECP induits par l'HVE-1 sur notre modèle cellulaire, ii) évaluer l'effet de molécules antivirales et iii) réaliser un criblage d'un grand nombre de molécules antivirales. De plus, cette étude a confirmé, dans des conditions standardisées, un meilleur effet du GCV par rapport à l'ACV contre l'HVE-1, l'HVE-3 et l'HVE-4. Ce système d'analyse est adaptable à l'étude de tous virus provoquant la destruction de cellules adhérentes. Les résultats apportés par notre étude montrent clairement l'intérêt d'utiliser l'xCELLigence® en virologie et notamment pour l'étude de molécules antivirales.

2. Identification de composés antiviraux contre l'herpèsvirus équin 1 à l'aide d'un criblage basé sur des tests cellulaires en temps réel : efficacité de la décitabine et du valganciclovir seuls ou en combinaison.

Article 2

C. Thieulent, E. Hue, G. Sutton, C. Fortier, P. Dallemagne, S. Zientara, H. Munier-Lehmann, A. Hans, R. Paillot, P-O. Vidalain & S. Pronost



Antiviral Research 2020 ; 183

PMID : 32926887

DOI : 10.1016/j.antiviral.2020.104931

Article 3

C. Thieulent, C. Fortier, H. Munier-Lehmann, P. Suzanne, P. Dallemagne, S. Zientara, A. Hans, R. Paillot, P-O. Vidalain, S. Pronost, E. Hue



Data in Brief (2020) - Soumis

2.1. Introduction

La précédente étude (article 1 : Thieulent et al. ; 2019) a mis en évidence l'intérêt de l'appareil RTCA xCELLigence® pour suivre en temps réel l'infection cellulaire par l'HVE-1 et pour réaliser le criblage à moyen/haut débit de molécules antivirales *in vitro*. Cette technologie permet notamment de suivre simultanément et de manière indépendante 6 plaques de 96 puits.

Au cours de cette deuxième étude, 2 891 molécules ont été criblées *in vitro* contre l'HVE-1 à l'aide de la technologie RTCA xCELLigence® (Article 2 : Thieulent et al., 2020a ; article 3 : Thieulent et al. ; 2020b (soumis)). Les molécules testées provenaient de 3 chimiothèques distinctes : i) l'ensemble de la chimiothèque Prestwick®, regroupant près de 1 199 molécules d'origines diverses et approuvées pour plus de 99% d'entre elles par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) et l'agence de médecine européenne (EMA), ii) une partie de la chimiothèque du CERMN (1 651 molécules), iii) ainsi qu'une banque, élaborée par nos soins, de molécules connues ou suspectées de présenter un effet antiviral contre un ou plusieurs virus humains (41 molécules). L'ensemble des résultats du criblage des 2 891 molécules est décrit dans l'article 3.

Les molécules candidates présentant la meilleure efficacité ont été évaluées sur différents modèles cellulaires (ED, EEK et RK13) et avec différentes souches d'HVE-1 (C₂₂₅₄/G₂₂₅₄/A₂₂₅₄) afin d'identifier une à deux molécules présentant le meilleur potentiel. Une étude de combinaison a également été réalisée entre les composés les plus efficaces et l'analyse des résultats a été faite en utilisant 3 algorithmes distincts (MacSynergy II, isobologramme et Chou-Talalay). Enfin, le mode d'action de la décitabine, une des molécules les plus efficaces et n'ayant jamais été décrite comme molécule antivirale contre un virus à ADN, a été investigué.

2.2. Article 2

Antiviral Research 183 (2020) 104931



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral

Research paper

Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: Efficacy of decitabine and valganciclovir alone or in combination

Côme Thieulent^{a,b}, Erika S. Hue^{a,b,c}, Gabrielle Sutton^{a,b}, Christine Fortier^{a,b,c}, Patrick Dallemagne^d, Stephan Zientara^e, Hélène Munier-Lehmann^f, Aymeric Hans^g, Romain Paillot^{a,b}, Pierre-Olivier Vidalain^{h,i}, Stéphane Pronost^{a,b,c,*}

^a LABÉO Frank Duncombe, 14280, Saint-Contest, France

^b Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450, 14280, Saint-Contest, France

^c Normandie Univ, UNICAEN, ImpedanCELL, 14280, Saint-Contest, France

^d Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, 14000, Caen, France

^e Université Paris-Est, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, INRAE, ENVA, UMR 1161 Virologie, 94700, Maisons-Alfort, France

^f Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, CNRS UMR 3523, 75015, Paris, France

^g ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Site de Normandie, PhEED Unit, 14430, Goustranville, France

^h CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, F-69007, Lyon, France

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



ARTICLE INFO

Keywords:

Real-time cell assay
Chemical library screening
Antiviral
Equid herpesvirus-1
Ganciclovir
Decitabine
Synergism

ABSTRACT

Equid herpesvirus-1 infections cause respiratory, neurological and reproductive syndromes. Despite preventive treatments with vaccines, resurgence of EHV-1 infection still constitutes a major threat to equine industry. However, no antiviral compound is available to treat infected horses. In this study, 2891 compounds were screened against EHV-1 using impedance measurement. 22 compounds have been found to be effective *in vitro* against EHV-1. Valganciclovir, ganciclovir, decitabine, aphidicolin, idoxuridine and pritelivir (BAY 57-1293) are the most effective compounds identified, and their antiviral potency was further assessed on E. Derm, RK13 and EEK cells and against 3 different field strains of EHV-1 (ORF30 2254 A/G/C). We also provide evidences of synergistic interactions between valganciclovir and decitabine in our *in vitro* antiviral assay as determined by MacSynergy II, isobologram and Chou-Talalay methods. Finally, we showed that deoxycytidine reverts the antiviral effect of decitabine, thus supporting some competition at the level of nucleoside phosphorylation by deoxycytidine kinase and/or DNA synthesis. Deoxycytidine analogues, like decitabine, is a family of compounds identified for the first time with promising antiviral efficacy against herpesviruses.

1. Introduction

Herpesviruses (order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*) are enveloped viruses with a linear, double-stranded DNA genome of 125–290 kb. Among the five equid herpesviruses (EHV-1 to 5) frequently isolated in horses, EHV-1 is the most pathogenic and is endemic worldwide. EHV-1 infection in horses is associated with several clinical signs of disease, from usually mild respiratory distress, cough and discharge, to more severe secondary forms of diseases such as abortion, neonatal foal death and equine herpes myeloencephalopathy (EHM) (Allen et al., 2004). The

prevalence of latent EHV-1 is estimated to be greater than 60% in horse population (Lunn et al., 2009).

Several vaccines are available against EHV-1. Their use reduces clinical signs of respiratory disease and virus shedding, which limits the extent of outbreaks. However, the protection provided against the secondary forms of the disease presents some limitations. While EHV-1 induced abortion storms have been reduced since the introduction of vaccination three decades ago, none of the commercially available EHV-1 vaccines have demonstrated its efficacy to prevent EHM. EHV-1 vaccine coverage is often too low to provide effective herd immunity. In this

* Corresponding author. LABÉO Frank Duncombe, 14280, Saint-Contest, France.

E-mail address: stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr (S. Pronost).

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104931>

Received 12 June 2020; Received in revised form 28 August 2020; Accepted 6 September 2020

Available online 11 September 2020

0166-3542/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

context, outbreaks still occur worldwide in horse populations. A recent outbreak reported in France in 2018 (Sutton et al., 2019), led to the cancellation of more than 200 horse competitions, thus generating large economic losses for the French equine industry. To complement prevention measures, such as vaccination and biosecurity, the use of antiviral treatment is sometimes considered for the treatment of severe EHV-1 diseases, especially EHM. The occasional use of aciclovir during EHV-1 outbreaks has been reported (Friday et al., 2000; Henninger et al., 2007; Murray et al., 1998) but the therapeutic efficacy of this compound is difficult to assess in the absence of untreated animals as a control. Two experimental infections in horses treated with valaciclovir, an aciclovir pro-drug, have also shown divergent results (Garre et al., 2009; Maxwell et al., 2008).

EHV-1 is an alphaherpesvirus genetically closely related to herpes simplex virus type 1 (HHV-1) and varicella zoster virus (HHV-3) for which antiviral therapies are available. However, the emergence of human herpesvirus strains resistant to antiviral treatments, such as aciclovir, has motivated researches for new antiviral therapies (Jiang et al., 2016) and helicase primase inhibitors seem to be good candidates (James et al., 2015; Kleymann et al., 2002). Over the last two decades, drug repositioning has proven to be an effective strategy to meet therapeutic needs with nearly a hundred drugs repositioned since (Jourdan et al., 2020). Even in absence of approved EHV-1 antiviral treatment for practitioners, few antiviral molecules have been studied against EHV-1 *in vitro* and correspond to those already used in human medicine against herpesviruses such as aciclovir, ganciclovir, cidofovir and penciclovir (Maxwell, 2017; Vissani et al., 2016). Other compounds such as aphidicolin (Goodman et al., 2007), A-5021 (Glorieux et al., 2012), quercetin (Ferreira et al., 2018; Gravina et al., 2011) and the histone demethylase inhibitor OG-L002 (Tallmadge et al., 2018) have been studied against EHV-1 in different cell culture models. However, these molecules have never been tested in a standardised cellular model allowing proper comparisons.

We have recently developed a standardised Real-Time Cell Analysis (RTCA) model for evaluating the effect of antiviral compounds against EHV-1. This system relies on the measurement of cellular impedance in culture wells, which reflects cellular adhesion and proliferation. Results are expressed as Cell Index (CI) that enables a standardised and accurate analysis of EHV-1 cytopathic effects. This system has proven successful to determine the efficacy of molecules against EHV-1 such as spironolactone (Thieulent et al., 2019). In the present work, a chemical library of 2891 compounds comprising new chemical entities and FDA-approved drugs has been screened by impedancemetry to identify compounds against the EHV-1 Kentucky D (KyD) reference strain. As some associations between a DNA polymerase (ORF30) genotype (G/A at position 2254) and the type of disease have been reported by several studies (Goodman et al., 2007; Lunn et al., 2009; Nugent et al., 2006; Pronost et al., 2010), active molecules identified were subsequently tested against a panel of EHV-1 strains (A₂₂₅₄ or G₂₂₅₄), including the newly identified EHV-1 ORF30 variant (C₂₂₅₄) (Paillot et al., 2020). Decitabine was one of the most effective molecules identified, and the mode of action of this cytidine analogue has been further investigated.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Equine dermal fibroblasts (E. Derm, NBL-6 ATCC® CCL-57™, Manassas, VA), equine embryonic kidney cells (EEK, kindly provided by Merial, France) and rabbit kidney cells (RK13, ATCC® CCL-37™) were used in this study. E. Derm cells were maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC®) and seeded at 1.2×10^4 cells/well in 96-well plates. EEK cells were maintained in MEM Alpha (Biowest, Nuaille, France) supplemented with 2% Lactalbumin hydrolysate (Sigma, St. Quentin Fallavier, France), 1% L-glutamine (Eurobio, Courtaboeuf, France), 0.5% D-Glucose (Sigma) and seeded at 1.2×10^4 cells/well in

96-well plates. RK13 cells were maintained in EMEM with Earle's salts (Eurobio) supplemented with 1% L-glutamine (Eurobio) and seeded at 4.8×10^4 cells/well for 96-well plates. All media contained 10% fetal bovine serum (Eurobio), 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin B (Eurobio) and were cultivated at 37 °C and 5% CO₂.

2.2. EHV-1 strains

The EHV-1 Kentucky D (KyD) strain (ATCC® VR-700™) was used as the EHV-1 reference strain for compound screening and subsequently to confirm the antiviral effect of selected hits in the different cell lines. In addition, three French EHV-1 strains were also used in this study, including the ORF30 G₂₂₅₄ EHV-1 strain (FR-38991) isolated in 2009 from a horse with neurological disorders (LABÉO, France; nasal swab), the ORF30 A₂₂₅₄ EHV-1 strain (FR-6815) isolated in 2013 from lung biopsies of an aborted foetus (LABÉO, France) and the ORF30 C₂₂₅₄ EHV-1 strain (FR-56628) isolated in 2018 from PBMC of a horse with respiratory disorders (LABÉO, France) (Paillot et al., 2020). E. Derm and RK13 cells were infected with the KyD strain at MOIs of 0.01 and 0.04, respectively. EEK cells were infected with the four different EHV-1 strains at a MOI of 0.05.

2.3. Compounds

This study includes 2891 compounds from three different libraries: i) 1199 compounds from the Prestwick® Chemical Library, containing mostly US Food and Drug Administration approved drugs (Prestwick Chemical, Illkirch, France) provided at 2 mg/mL in DMSO; ii) 1651 compounds from the Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN, Caen, France) provided at 10 mM in DMSO; iii) 41 compounds (called herein in-house antiviral library) selected for their effects against different human viruses and dissolved at 10 mM in DMSO (Supplementary Table 1). RG108 (MedChemExpress) was dissolved at 20 mM in DMSO. All compounds were stored at -20 °C before used.

2.4. Screening of compound libraries using the RTCA system

The screening by impedancemetry was performed with EHV-1 KyD-infected E. Derm cells using the RTCA MP system (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA) as previously described (Thieulent et al., 2019). Control cells were treated with 0.5% DMSO in presence or absence of the virus. The screening was performed under blind conditions and 80 compounds were tested by plate at a final concentration of 10 µg/mL (Prestwick® Chemical Library), 10 µM (CERMN library) or 50, 10, 2 and 0.4 µM (in-house antiviral library) in 0.5% DMSO. Each plate includes the controls required for calculation of the Z'-factor (Zhang et al., 1999). Only plates with a Z'-factor upper than 0.5 were considered for further analysis as previously described by Thieulent et al. (2019). For each compound, the area under normalised Cell Index (CI) curves was calculated from 0 to 96 h post-infection (hpi) (AUC_n; (Pan et al., 2013). The time required for the CI to decrease by 50% after virus infection was also determined (CIT₅₀; (Fang et al., 2011), and compared with controls. All the details are presented in Data in Brief (Thieulent et al., submitted). Any increase in these two parameters reflects some protection of E. Derm cells from EHV-1 induced cytopathic effects. The cut-off determined for a molecule to be considered with an antiviral potential were (i) the AUC_n increasing by 25%, and (ii) the CIT₅₀ being delayed by > 8 h as compared to non-treated cells (Thieulent et al., 2019).

After the screening, dose-response curves were obtained for each selected compound by using percentage of inhibition calculation. The following formula was used: Inhibition (%) = $100 \times [1 - (a - b) \div (b - c)]$, where a corresponds to the value of infected cells treated with different concentrations of compounds, whereas b and c correspond to

values obtained for mock-infected and mock-treated cells, respectively.

2.5. Viral quantitation by qPCR assay

Cells were seeded and treated in 96-well plates as described in part 2.4. At 48 hpi, plates were frozen at -20°C to allow virus load quantitation in culture wells. After one cycle of freeze/thaw, nucleic acids were extracted using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions and stored at -20°C until used. Quantitative PCR for EHV-1 was processed as previously described (Thieulent et al., 2019). Each thermal cycling was performed on a QuantStudio™ 12 K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies).

2.6. Toxicity measurement

Cells were seeded in white opaque 96-well plates and after 24 h of culture, were treated with compounds. Cell viability was measured at 48 h post-treatment (hpt) by impedancemetry and ATP measurement using the CellTiter Glo® Luminescent Cell Viability Kit (CTG; Promega, Charbonnière-les-bains, France), according to the manufacturer's instructions. Luminescence signal was acquired using an Infinite® M200 luminometer (Tecan, Lyon, France).

2.7. Research of synergistic effects between compounds against EHV-1

Drug combinations were tested on EHV-1 KyD-infected E. Derm cells using impedancemetry as a read out. For each combination, the two selected drugs were prepared separately by 2-fold serial dilution and mixed in 96-well plates to create an 8 by 10 matrix of single and combined diluted drugs. For each compound, the dilution range was designed to have the EC_{50} in the middle of the range, and the highest concentration inferior to the EC_{90} . In each plate, infected and non-infected cells with 1% DMSO were used as positive and negative controls, respectively. Synergistic or antagonistic effects were determined with the MacSynergy II program using first the Bliss independence model (Prichard and Shipman, 1990) applied on AUC_n values. This software calculated the volume of synergy/antagonism produced by the drug combination in a 95% confidence interval. Volumes were given as the area under a dose-response curve in the two dimensional situation ($\mu\text{M}^2\%$) and interpretation was made as previously described by Prichard and Shipman (1990). Values of 0–25, 25–50, 50–100, and $>100 \mu\text{M}^2\%$ in either a positive or negative direction were defined as additive, minor synergy or antagonism, moderate synergy or antagonism, and strong synergy or antagonism, respectively.

Isobologram analysis and the Chou-Talalay method using the Loewe additivity model were used to confirm synergistic effect firstly observed by MacSynergy II program. Isobolograms were built as previously described by Feng et al. (2009) from EC_{50} values obtained by impedance measurement. The Chou-Talalay method is based on the median-effect equation and computed by CompuSyn software version 1.0 (ComboSyn, Inc., Paramus, New Jersey) (Chou and Talalay, 1984). The software extrapolated a combination index representing the interaction between two drugs from the percentage of inhibition of Log_{10} viral genome copies number produce in presence of each drug alone and in combination. The weighted average combination index (CI_{w}) value was calculated as previously described (Drouot et al., 2016).

2.8. Statistical analysis

EC_{50} and CC_{50} values were calculated using a non-linear regression dose response inhibition curve (GraphPad Prism® software 6.0; La Jolla, CA, USA). The Selectivity Index (SI) was determined for each compound using the following formula: $\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$. Spearman's correlation test and values comparison using ANOVA with Tukey post hoc test were both statistically evaluated using GraphPad Prism® software.

3. Results

3.1. Screening and selection of the most effective compounds against EHV-1

To identify novel antiviral compounds against EHV-1, three chemical libraries (i.e. Prestwick® Chemical, CERMN and in-house antiviral libraries; see Material and Methods for details) were screened by impedance-based Real-Time Cell Analysis (RTCA) using equine dermal (E. Derm) cells infected with EHV-1 KyD strain as model (Supplementary Fig. 1). Z'-factor values of the 38 screening 96-well plates were between 0.52 and 0.91, with a median of 0.71, insuring the robustness of our assay. Based on CIT_{50} and AUC_n values, 25 out of 2891 compounds were identified with a potential antiviral activity (hit detection rate of 0.9%) against EHV-1 (14, 1 and 10 in the three chemical libraries, respectively).

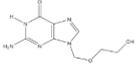
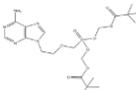
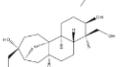
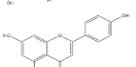
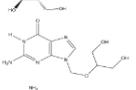
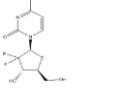
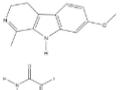
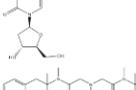
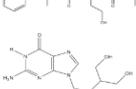
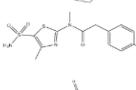
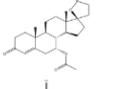
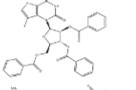
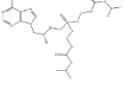
These molecules were then evaluated in dose-response assays on E. Derm cells by two-fold serial dilution (50–0.1 μM) by qPCR assay and impedance measurement. Antiviral properties were confirmed for 22 out of the 25 compounds (Table 1), and EC_{50} values were precisely determined by both qPCR and RTCA for 16 of them ($\text{EC}_{50} < 50 \mu\text{M}$). The R factor of 0.841 and p-value < 0.001 obtained by Spearman's correlation showed a good correlation between EC_{50} values obtained by qPCR and RTCA for these 16 molecules (Fig. 1). Among these compounds, eight were selected as they complied with more stringent criteria: (i) the absence of toxicity on E. Derm cells at all the concentrations tested ($\text{CC}_{50} > 50 \mu\text{M}$) and (ii) EC_{50} values below $50 \mu\text{M}$ at all time points between 48 and 120 hpi (Fig. 2A). Dose-responses curves obtained by qPCR and RTCA at 48 hpi for the eight compounds are presented in Fig. 2B. Three of these compounds were acyclic guanosine analogues (aciclovir, ACV; ganciclovir, GCV; and ganciclovir prodrug valganciclovir, VGCV) inhibiting the viral DNA polymerase, two were deoxycytidine analogues (decitabine, DTB; gemcitabine, GTB) used for tumor growth inhibition by incorporation in cellular DNA, and one was a deoxyuridine analogue (idoxuridine, IDU) targeting viral DNA synthesis. Aphidicolin (APD), a tetracyclic diterpene antibiotic, and pritelivir (BAY 57–1293), an inhibitor of the HHV-1 helicase-primase complex, were also selected.

3.2. Efficacy of eight selected compounds on different EHV-1 strains and cell lines

The antiviral activity of the eight selected compounds was further studied against EHV-1 KyD using two other cellular models: an equine cell line (EEK) and a rabbit cell line (RK13) and results were compared with data obtained on E. Derm cells (Fig. 3A). Gemcitabine did not show any antiviral effect at tested concentrations on EEK and RK13 cells ($\text{EC}_{50} > 50 \mu\text{M}$). With EC_{50} ranging from 21.6 to 31.0 μM , aciclovir shows a weak antiviral activity on the three cell models. The six other compounds (aphidicolin, pritelivir, decitabine, idoxuridine, ganciclovir and valganciclovir) showed a good efficacy on the three cell lines.

The efficacy of the eight selected compounds was tested against three different EHV-1 strains with distinct ORF30 genotypes (A/G/C₂₂₅₄) on EEK cells (Fig. 3B). This study confirmed the low activity of gemcitabine ($\text{EC}_{50} > 50 \mu\text{M}$). Aciclovir showed a lower activity against the FR-38991 strain (G₂₂₅₄: 36.0 μM) when compared with its activity against FR-6815 (A₂₂₅₄: 14.2 μM) or FR-56628 (C₂₂₅₄: 7.9 μM). Quite similarly, pritelivir and idoxuridine showed a lower activity against FR-38991 strain (2.7 μM and 5.7 μM , respectively) when compared with its activity against FR-6815 (0.9 μM and 1.5 μM , respectively) or FR-56628 (1.0 μM and 1.5 μM , respectively). Consistent results were obtained with the other molecules across all EHV-1 strains.

Table 1
List of compounds presenting an antiviral effect against EHV-1 KyD strain on E. Derm cells.

Class of compounds	Compounds	Structures	Impedance measurement using Real Time Cell Analysis (RTCA) system			qPCR assay	CellTiter Glo (CTG)	SI ^f	Supplier
			EC ₅₀ [μ M (S.D.)] ^a	CC ₅₀ [μ M (S.D.)] ^b	SI ^c	EC ₅₀ [μ M (S.D.)] ^d	CC ₅₀ [μ M (S.D.)] ^e		
Acyclic guanosine analogue	Aciclovir (ACV)		30.1 (13.3)	>50	>1.7	49.4 (3.7)	>50	>1.01	Prestwick Chemical
Acyclic cytidine monophosphate analogue	Adefovir dipivoxil (ADV)		0.8 (0.3)	3.2 (1.4)	4.0	0.1 (0.0)	3.7 (2.1)	37.0	TargetMol
Diterpene	Aphidicholin (ADP)		3.4 (3.3)	>50	>14.7	1.4 (0.2)	>50	>35.7	MedChem express
Flavonoid	Apigenin (APG)		>50	>50	N.D.	31.0 (22.5)	>50	>1.6	Prestwick Chemical
Acyclic cytidine monophosphate analogue	Cidofovir (CDV)		20.7 (4.7)	>50	>2.4	23.3 (10.0)	>50	>2.1	Prestwick Chemical
Deoxycytidine analogue	Cytarabine (CTB)		24.3 (7.6)	31.2 (2.6)	1.3	4.1 (1.3)	>50	>12.2	TargetMol
Deoxycytidine analogue	Decitabine (DTB)		0.5 (0.1)	>50	>100	1.1 (0.5)	>50	>45.5	TargetMol
Acyclic guanosine analogue	Ganciclovir (GCV)		2.7 (1.3)	>50	>18.5	2.8 (0.9)	>50	>17.9	Prestwick Chemical
Deoxycytidine analogue	Gemcitabine (GTB)		12.0 (3.4)	>50	>4.2	0.7 (0.3)	>50	>71.4	TargetMol
Alkaloid	Harmin (HAR)		>50	>50	N.D.	13.6 (7.6)	>50	>3.7	Prestwick Chemical
Deoxyuridine analogue	Idoxuridine (IDU)		4.9 (1.5)	>50	>10.2	4.7 (1.6)	>50	>10.6	Prestwick Chemical
Pseudopeptide	Oxethacaine (OXT)		34.9 (20.2)	>50	>1.4	19.3 (6.7)	21.05 (4.8)	1.1	Prestwick Chemical
Acyclic guanosine analogue	Penciclovir (PCV)		9.8 (6.1)	>50	>5.1	>50	>50	N.D.	TargetMol
Phenylpyridine	Pritelivir (BAY 57-1293)		12.6 (1.8)	>50	>4.0	6.6 (0.7)	>50	>7.6	MedChem express
Steroid lactone	Spironolactone (SPR)		36.0 (1.3)	>50	>1.4	27.7 (6.8)	>50	>1.8	Prestwick Chemical
Nucleoside analogue	sr6362		8.4 (4.5)	>50	>6.0	>50	>50	N.D.	CERMN
Acyclic cytidine monophosphate analogue	Tenofovir disoproxil (TDF)		>50	17.7 (3.7)	N.D.	3.0 (1.4)	35.8 (15.5)	11.9	TargetMol

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Class of compounds	Compounds	Structures	Impedance measurement using Real Time Cell Analysis (RTCA) system			qPCR assay	CellTiter Glo (CTG)	SI ^f	Supplier
			EC ₅₀ [μ M (S.D.)] ^a	CC ₅₀ [μ M (S.D.)] ^b	SI ^c	EC ₅₀ [μ M (S.D.)] ^d	CC ₅₀ [μ M (S.D.)] ^e		
Phenothiazine	Thiethylperazine dimaleate (THT)		>50	17.6 (2.4)	N.D.	10.3 (2.8)	10.1 (0.9)	1.0	Prestwick Chemical
Deoxyuridine analogue	Trifluridine (TFT)		21.6 (10.9)	>50	>2.3	5.3 (1.6)	>50	>9.4	Prestwick Chemical
Acyclic guanosine analogue	Valaciclovir (VACV)		34.7 (4.3)	>50	>1.4	23.5 (3.6)	>50	>2.1	TargetMol
Acyclic guanosine analogue	Valganciclovir (VGCV)		1.7 (0.3)	>50	>29.4	1.8 (0.3)	>50	>27.8	TargetMol
Adenosine analogue	Vidarabine (VDR)		12.9 (6.2)	>50	>3.9	8.3 (0.7)	>50	>6.0	Prestwick Chemical

Data presented in this table are the mean (S.D.) of three independent experiments.

EC₅₀: EC₅₀ half maximal effective concentration measured by impedance using Real-Time Cell Analysis (RTCA) system or EC₅₀ qPCR assay.

CC₅₀: CC₅₀ half maximal cytotoxic concentration measured by impedance using RTCA system or CC₅₀ CellTiter-Glo (CTG) method. "CC₅₀ > 50" means that the compound did not show toxicity at the highest concentration tested (50 μ M).

SI: Selectivity Index is the ration of CC₅₀ obtained by RTCA to EC₅₀ obtained by RTCA^c or CC₅₀ obtained by CTG to EC₅₀ obtained by qPCR^f. If "CC₅₀ > 50", an arbitrary value of SI is calculated with 50 μ M, but it is probably underestimated.

Bold compounds are the selected compounds in part 3.1 of results.

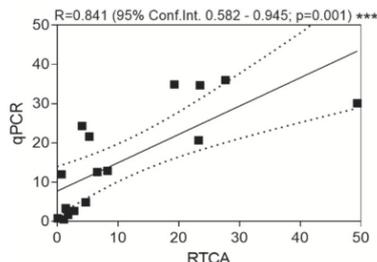


Fig. 1. Correlation plot between EC₅₀ values obtained by qPCR and RTCA from compounds presenting an antiviral effect against EHV-1 KyD strain (n = 16). Compounds with an EC₅₀ well defined by qPCR or RTCA were included in this calculation (we excluded data with EC₅₀ > 50 μ M). Spearman correlation coefficient (R), p-value and confidence interval (Conf.Int.) are presented.

3.3. Research of synergistic effect and antiviral activity of the valganciclovir/decitabine combination

Dual-combinations were tested between valganciclovir, one of the best candidates, and four other compounds (aphidicolin, pritelivir, decitabine and idoxuridine) for synergistic or antagonistic effects against EHV-1. Using MacSynergy II analysis, only the valganciclovir/decitabine combination showed a synergistic effect that is illustrated by the strong signal above additive effects in the matrix of drug interactions (Fig. 4A). The synergy volume of 63.24 μ M² obtained supports a moderate synergy (Table 2). The peak of synergy was reached when both compounds were used at 0.63 μ M (1:1 ratio). Likewise, evaluation of the combination valganciclovir/decitabine by the isobologram method indicated synergy with ADA values of -0.30 ($p < 0.001$) (Fig. 4B). Results obtained by impedanceometry were also confirmed by

viral genome copy number measurement at 48 hpi and median-effect analysis for concentrations of valganciclovir and decitabine used alone or in combination at a 1:1 ratio. A synergistic effect was observed for the valganciclovir/decitabine combination as assessed by a weighted average combination index (CI_w) of 0.20 (Fig. 4C). The three other combinations (valganciclovir/aphidicolin, valganciclovir/pritelivir, valganciclovir/idoxuridine) tested were additive when measured by MacSynergy II method (Table 2) and were not tested by isobologram nor median-effect analysis. No cytotoxicity was observed at the maximal drug combinations tested for the four different combinations (Supplementary Fig. 2).

3.4. Decitabine pre-treatment did not confer cell resistance to EHV-1 replication

Although valganciclovir was developed as an antiviral against herpesviruses in the first place, this is not the case of decitabine. Indeed, decitabine is an anticancer agent which induces hypomethylation after integration in cellular DNA (Liu et al., 2007). To evaluate whether decitabine integration in target cell DNA provides protection from EHV-1 infection, cells were treated overnight with decitabine before infection and/or just after infection. Both results obtained by cell impedance measurement (Fig. 5A) and EHV-1 viral load measurement (Fig. 5B) showed that decitabine pre-treatment did not protect cells from CPE formation and virus replication. A post-infection treatment with decitabine was required to observe some significant inhibition of EHV-1 replication. The effect of RG108, another well known DNA methyltransferase inhibitor, was then tested against EHV-1 on E. Derm cells. RG108 did not show any antiviral effect when assessed by impedance measurement (Fig. 6A) or virus load quantitation (Fig. 6B). Altogether, this suggests that cellular DNA hypomethylation does not account for the inhibition of EHV-1 by decitabine.

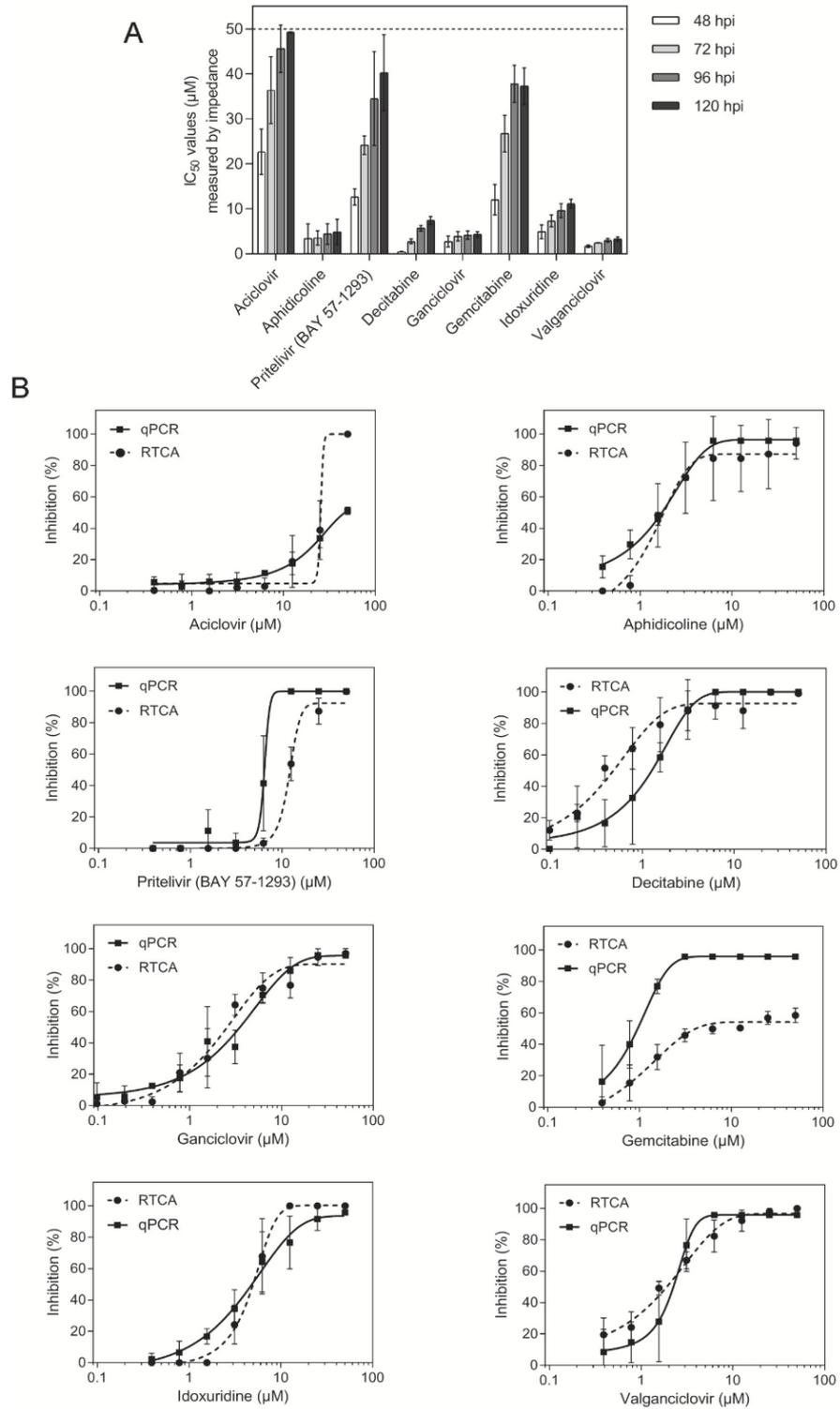


Fig. 2. Antiviral effect of selected compounds against EHV-1 KyD strain on E. Derm cells. (A) Half maximal effective concentration (EC₅₀) measured at different times post-infection using impedance measurement (48–120 hpi). The dotted line represents the cut off EC₅₀ value. (B) Dose-response curves obtained by qPCR (plain line) and RTCA (dotted line) for the eight retained compounds against EHV-1 at 48 hpi. Results are from three independent experiments.

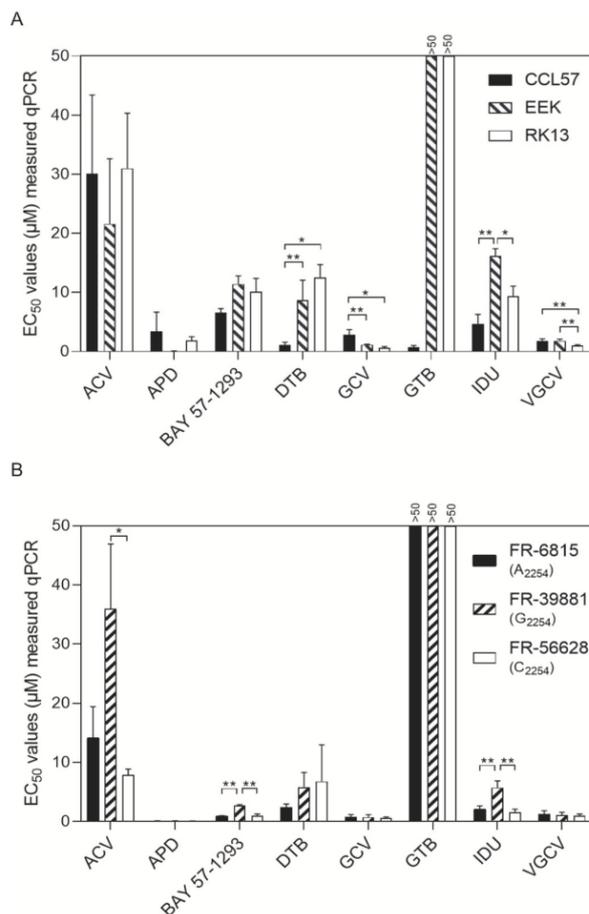


Fig. 3. Antiviral effect of the eight selected compounds on different cell lines and against different EHV-1 strains. (A) Susceptibility of EHV-1 KyD strain to the 8 selected antiviral compounds on three different cell lines: E Derm, EEK and RK13. Results are from three independent experiments (*p < 0.05, **p < 0.01). (B) Susceptibility of three French isolates of EHV-1 to the 8 selected antiviral compounds. G₂₂₅₄ indicates a guanine in ORF30 position 2254 (Aspartic Acid (D₇₅₂)) in position 752 of the protein, A₂₂₅₄ indicates an adenine (Asparagine (N₇₅₂)) and C₂₂₅₄ indicates a cytidine (Histidine (H₇₅₂)). EC₅₀ values were obtained by qPCR on EEK cells. Results are from three independent experiments (*p < 0.05, **p < 0.01).

3.5. Deoxycytidine competitively inhibits the antiviral effect of decitabine

Decitabine is a deoxycytidine analogue and a pro-drug that must be successively phosphorylated by components of the deoxyribonucleoside salvage pathway involving deoxycytidine kinase (DCK), CMP mono-phosphate kinase (in particular CMPK1) and nucleotide diphosphate kinases (Momparker et al., 2005; Stresemann and Lyko, 2008). It has been shown that high levels of deoxycytidine (dC) can reverse the anticancer activity of gemcitabine, another dC analogue, by competition for DCK-mediated phosphorylation, the rate-limiting step in dC phosphorylation to dCTP (Halbrook et al., 2019). We thus tested if dC could similarly reverse the inhibitory effects of decitabine on EHV-1. Infected E. Derm cells were treated with decitabine in the presence of high concentrations of dC or other nucleosides including cytidine, uridine, adenosine, guanosine (Fig. 7A). Of all tested nucleosides, only dC blocked the antiviral activity of decitabine. This result was confirmed by microscopic observations and impedancemetry as dC reversed the

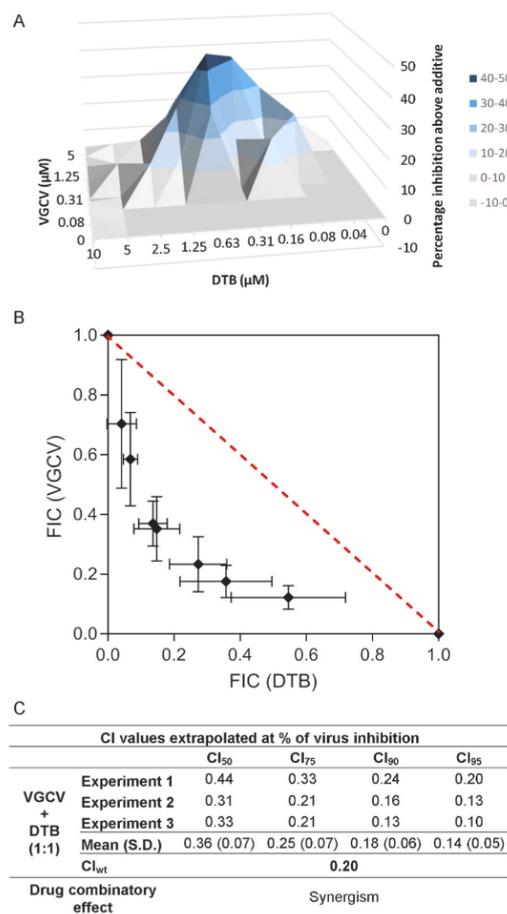


Fig. 4. Synergistic inhibition of EHV-1 KyD strain replication in E. Derm cells by combination of valganciclovir (VGCV) and decitabine (DTB). (A) Analysis of interaction of VGCV and DTB using impedance measurement with MacSynergy II software. Peaks of statistically significant (95% confidence level) synergy are shown above the plane in colours from grey to blue, with dark blue indicating a strong synergy. The volume of synergy for this interaction is 63.24 μM²%, which is interpreted as moderate synergy. Results are obtained from three independently experiments performed using impedance measurement. (B) Isobologram analysis of the interaction of VGCV and DTB using impedance measurement. The diagonally dotted line in red represents additivity. Values below and above this line are interpreted as synergist or antagonist, respectively. The ADA value for this interaction is -0.30 (p < 0.001) which is interpreted as synergy. Results are obtained from three independently experiments performed using impedance measurement. (C) Median-effect analysis table representing the interaction of VGCV and DTB at 1:1 ratio using qPCR assay. Combination Index (CI) was calculated using the Chou and Talalay equation (Chou and Talalay, 1984). CI < 1, CI = 1 and CI > 1 indicate synergism, additive and antagonism, respectively. The weighted CI is calculated as follows: CI_{wt} = (CI₅₀ + 2 × CI₇₅ + 3 × CI₉₀ + 4 × CI₉₅) ÷ 10. The CI_{wt} value for this interaction is 0.20 which is interpreted as synergy. Results are obtained from three independently experiments performed using qPCR assay.

antiviral effect of decitabine against EHV-1 (Fig. 7B and C). Altogether, these results demonstrate a competition of decitabine and dC for the same metabolic pathway in our *in vitro* infection model.

4. Discussion

In this study, 2891 compounds were screened against EHV-1 by

Table 2
Combination analysis of compounds against EHV-1 KyD strain on E. Derm cells.

Combinations	MacSynergy II analysis ^a		
	Synergy (μM ² %)	Antagonism (μM ² %)	Predicted interaction
VGCV + APD	0.16	-17.95	Additive
VGCV + BAY 57-1293	4.56	-1.27	Additive
VGCV + DTB	63.24	0	Moderate synergy
VGCV + IDU	1.5	0	Additive

^a Mean volumes of synergy or antagonism are presented based on 95% confidence levels using MacSynergy II method. Values determined using MacSynergy II software (Prichard and Shipman, 1990) via area under normalised curves (AUC_n) data from 0 to 96 h post-infection using impedance measurement. Results are obtained from three independently experiments.

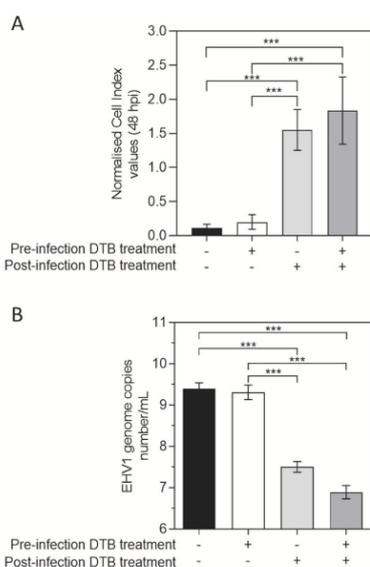


Fig. 5. Effect of decitabine (5 μM) pre-infection or post-infection treatment on E. Derm cells infected with EHV-1 KyD strain measured at 48 hpi by (A) impedance measurement and (B) viral genome copies number quantitation. Results are from three independent experiments (***p < 0.001).

impedancemetry as previously described (Thieulent et al., 2019), and 22 compounds were identified for their antiviral properties against this virus. AUC_n values coupled to CIT₅₀ calculation were the two major criteria for filtering raw data and identify hits. The antiviral effect of selected compounds was confirmed by dose-response assay using both impedancemetry and viral load quantitation. As the readouts were not the same, EC₅₀ values obtained with these two methods differed as previously reported (Piret et al., 2016; Thieulent et al., 2019). However, the good correlation observed between EC₅₀ values obtained by RTCA and qPCR demonstrates the pertinence of RTCA for antiviral evaluation. Among the 22 compounds inhibiting EHV-1, eight molecules were selected for further evaluations using stringent criteria, including EC₅₀ values below 50 μM over time and lack of cytotoxicity when used at 50 μM.

Ganciclovir and aciclovir are approved medications to treat herpesviruses and were previously shown to be effective against EHV-1 *in vitro* (Garre et al., 2007; Thieulent et al., 2019). Valganciclovir, the pro-drug and valine ester of ganciclovir, presents here an antiviral activity against EHV-1 similar to ganciclovir. Pritelivir is another antiviral drug developed to treat herpesviruses. It is an inhibitor of the helicase-primase complex of herpesviruses discovered in 2002 (Kleymann et al., 2002).

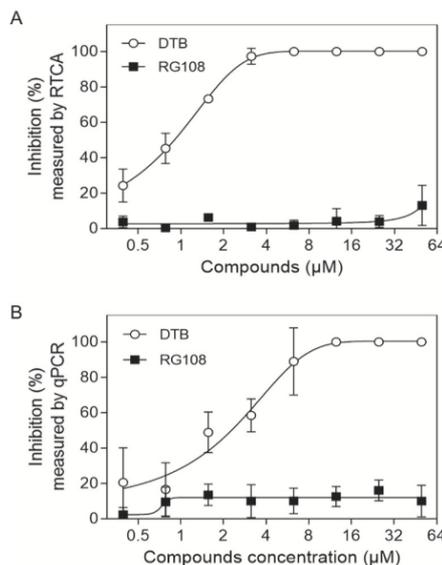


Fig. 6. Effect of the DNA methyltransferase inhibitor, RG108 and decitabine on E. Derm cells infected with EHV-1 KyD strain measured at 48 hpi by (A) impedance measurement and (B) viral genome copies number quantitation. Results are from three independent experiments.

The antiviral effect of pritelivir was previously reported against HHV-1 and HHV-2 (Betz et al., 2002). However, this study is the first demonstrating the antiviral effect of this molecule against equid herpesviruses and in particular against EHV-1. It would be interesting to evaluate the antiviral effect of these compounds against other equid herpesviruses, such as EHV-3. Idoxuridine is also a well-known antiviral compound against human herpesviruses such as HHV-1 and HHV-2, and is also active against different animal herpesviruses such as feline herpesvirus type-1 (De Clercq and Li, 2016; Maggs and Clarke, 2004). Interestingly, idoxuridine is one of the three deoxyuridine analogues, together with brivudine and trifluridine, which have been used for decades against herpes simplex viruses (De Clercq and Li, 2016). Idoxuridine and trifluridine have showed a good efficacy against EHV-1 without toxicity in our cellular model, whereas brivudine was inactive (data not shown). Brivudine is the only one that needs to be specifically phosphorylated by viral thymidine kinase (TK) to become active (De Clercq and Li, 2016), suggesting that EHV-1 TK is unable to phosphorylate brivudine, which is in line with previous reports (De Clercq, 1984; Kit et al., 1987). Maribavir is also a new nucleoside analogue in development against human cytomegalovirus (HHV-5, a betaherpesvirus) that was tested in our screen and was inactive against EHV-1 (data not show) (Price and Prichard, 2011). This result is in line with the lack of activity against the alphaherpesviruses HHV-1, HHV-2 and HHV-3 (Williams et al., 2003). Finally, our study showed that three deoxycytidine analogues, *i.e.* decitabine, gemcitabine and cytarabine, are all effective against EHV-1 infection *in vitro*. Decitabine and gemcitabine are respectively used in the treatment of acute myeloid leukemia (He et al., 2017) and recurrent ovarian cancer (Berg et al., 2019). Gemcitabine was previously characterized for its antiviral activity against a broad spectrum of RNA viruses (Shin et al., 2018). It has also been reported to be effective against HHV-1 (Denisova et al., 2012). However, to our knowledge, our work is the first reporting the antiviral effect of decitabine against herpesvirus. Of these three deoxycytidine analogues, cytarabine has the lowest activity with an EC₅₀ of 4.1 μM as determined by qPCR assay on E. Derm cells. Decitabine and gemcitabine were more potent EHV-1 inhibitors in this cellular model with EC₅₀s of 1.1 μM and 0.7 μM, respectively.

The antiviral activity of the 8 most efficient molecules was also

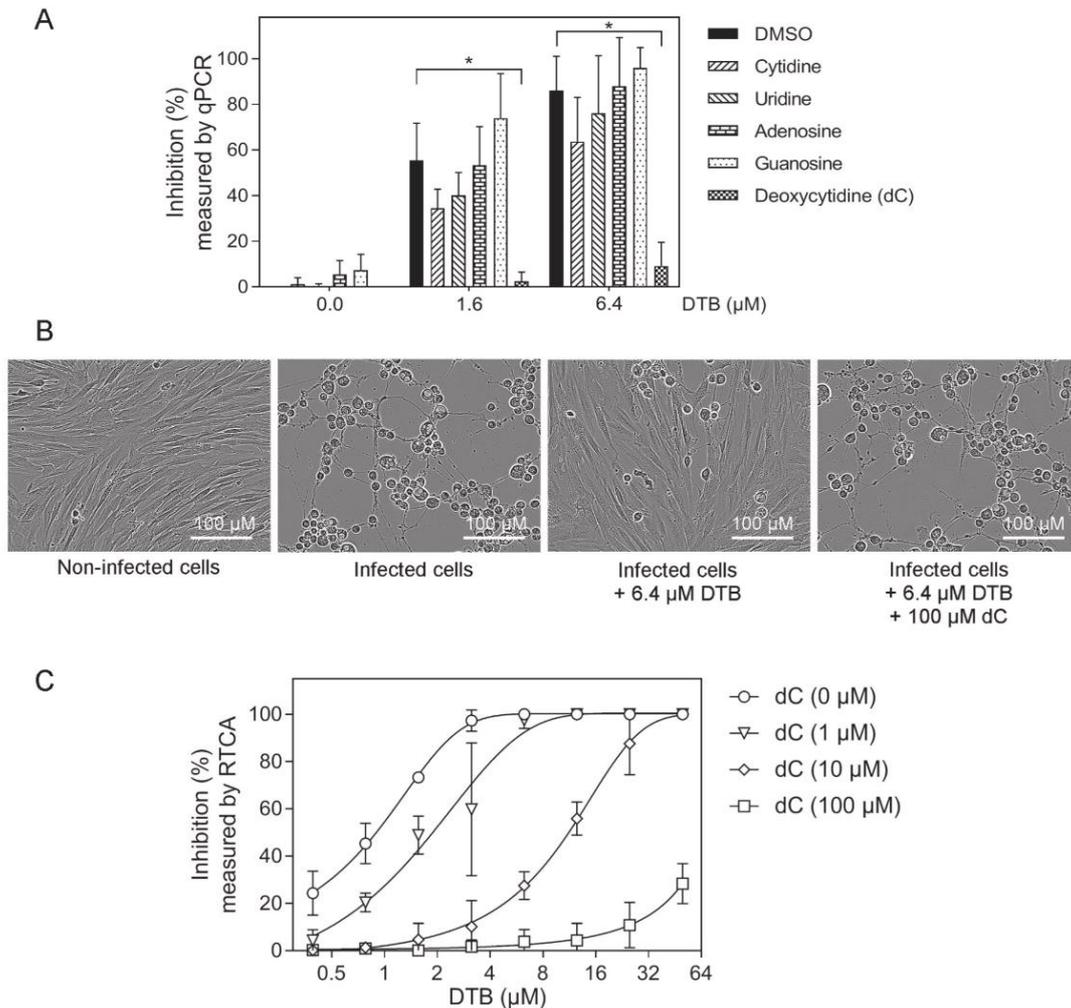


Fig. 7. Effect of deoxycytidine (dC) on the antiviral effect of decitabine (DTB) against EHV-1. (A) Viral genome copies number produces in the cell culture supernatant at 48 hpi in absence (0 μM) or presence (1.6 and 6.4 μM) of DTB with 100 μM of cytidine, uridine, adenosine, guanosine and dC. Results are obtained from five independent experiments (*p < 0.05). (B) Microscopic observation at 48 hpi of E. Derm cells infected or not by EHV-1 KyD strain in presence of DTB (6.4 μM) with or without dC (100 μM) treatment. (C) Impedance measurement at 48 hpi of E. Derm cells infected with EHV-1 KyD strain and treated with increased concentrations of DTB in the presence of the indicated concentration of dC. Results are from three independent experiments.

validated in three cell lines and against different strains of EHV-1. E. Derm cells and EEK cells are both equine cell lines and most adapted to identify new antiviral compounds in equid species, especially EEK that was derived from a horse foetus that is one of the target of EHV-1 (Léon et al., 2008; Smith et al., 2010). Even though RK13 cells are not equine cells, they have been most frequently used in EHV1 antiviral studies (Azab et al., 2010; de la Fuente et al., 1992; Gibson, 1992; Rollinson, 1987). All compounds except aciclovir and ganciclovir showed some consistent antiviral activity in the three different cell lines. Aciclovir is the least active of the eight selected compounds, and was inactive when used with EEK cells. More surprisingly, although ganciclovir is very effective on E. Derm cells, it has no antiviral activity on RK13 and EEK cells. This suggests that ganciclovir is not properly phosphorylated by RK13 and EEK cells kinases. In line with this hypothesis, decitabine, which is structurally very close to ganciclovir and also needs to be phosphorylated, is less active on EEK and RK13 cells. Nevertheless, decitabine still exhibits a good efficacy in all three cellular models. The antiviral activity of the eight selected molecules was also evaluated on

EEK cells infected with three different EHV-1 strains isolated during outbreaks in France. Each strain exhibits different nucleotide (A/G/C) at position 2254 of ORF-30 (DNA polymerase). EC₅₀ values of the compounds were close, independently of the strain used. This suggests that the mutations in the palm domain did not affect the effect of the selected molecule in agreement with previous reports comparing the susceptibility of A₂₂₅₄ and G₂₂₅₄ strains (Garre et al., 2007; Thieulent et al., 2019). Only aciclovir, pritelivir and idoxuridine were slightly less efficient on the FR-38991 (A₂₂₅₄) strain. No difference of susceptibility was observed between the three strains for aphidicolin treatment. This result differs from a previous report showing that a strain with the G₂₂₅₄ genotype is more sensitive to aphidicolin than a strain with the A₂₂₅₄ genotype (Goodman et al., 2007).

In this study, ganciclovir and its prodrug valganciclovir are the most effective compounds *in vitro* against EHV-1. Interestingly, the pharmacokinetic of valganciclovir was previously studied in horse (Carmichael et al., 2013), showing 40% bioavailability after oral administration. This positions valganciclovir as the best candidate in our short list of active

molecules for treating horses infected by EHV-1 even if the cost of the molecule could be a limitation. Nevertheless, our results should be considered only as a first step in this direction as the predictive value of *in vitro* models based on continuous cell lines is questionable. For example, the antiviral effect of aciclovir observed *in vitro* on cell lines infected by EHV-1 was not validated *ex vivo* when using respiratory mucosa explants as a model (Glorieux et al., 2012) and was not transposable *in vivo* using valaciclovir, the prodrug of aciclovir (Garre et al., 2009). Although data observed in this study are promising, further investigations are necessary on *ex vivo* models to confirm the antiviral effect of our lead compounds before *in vivo* experiments implementation.

This report is also the first analysis of drug combinations against EHV-1. Of all the combinations tested, only valganciclovir plus decitabine showed a synergic effect. It was previously demonstrated that gemcitabine in association with ganciclovir enhanced the antitumoral effects of HSV-TK suicide gene in a synergistic manner (Wang et al., 2016). This result is in agreement with our study.

To our knowledge, decitabine has never been reported to inhibit cellular infections by a herpesvirus. This led us to further investigate the mode of action of this compound. The pre-treatment of cells with decitabine did not provide antiviral effects against EHV-1, suggesting that decitabine incorporation in cellular DNA did not mediate the antiviral effect of decitabine. This rather suggests that the antiviral effect of decitabine depends on its incorporation into viral DNA and/or some interference with the viral polymerase. Decitabine is well-known for preventing DNA methylation and this account for its antitumoral properties (Atallah et al., 2007; Schmelz et al., 2005). We thus tested the antiviral effect of RG108, which is a hypomethylation agent acting differently through DNA methyltransferase inhibition. The absence of RG108 activity against EHV-1 suggests that the inhibitory effect of decitabine against EHV-1 is not mediated by viral or cellular DNA hypomethylation. Finally, we showed that the addition of dC to culture medium inhibits decitabine antiviral activity. This strongly suggests that dC and decitabine channel through the same metabolic pathway, including phosphorylation-dependent activation and incorporation into cellular and viral DNA. Based on collected observations, we propose that decitabine is integrated into the EHV-1 DNA and/or jams the viral polymerase, thus leading to the inhibition of viral growth. Interestingly, and as opposed to ganciclovir that needs activation by viral TK (Sullivan et al., 1992), decitabine phosphorylation only relies on cellular kinases to be activated and may represent a good candidate against viral strains resistant to ganciclovir.

In conclusion, the antiviral effect of ganciclovir/valganciclovir and aphidicolin was confirmed against EHV-1. Most importantly, new EHV-1 inhibitors were identified, including idoxuridine, pritelivir and decitabine. The synergy observed between valganciclovir and decitabine is particularly interesting due to the complementarity of their mode of actions, and further investigations *ex vivo* and *in vivo* are warranted.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by LABÉO, IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation, project AMIE), Fonds Eperon (project N87–2014, N07–2015, N07–2016, N13–2017 and N62–2017), Région Normandie (CPER R25 P3) and CENTAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF opérationnel programme 2014–2020. We would like to thank Laurent Lemaitre from Boehringer Ingelheim, France who kindly provided us with EEK cells. We thank Christophe Denoyelle and Emilie Brotin from ImpedanCELL, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France for interacting and for their technical assistance with RTCA technology. We also thank Camille Normand and all collaborators of the SAVE

project.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104931>.

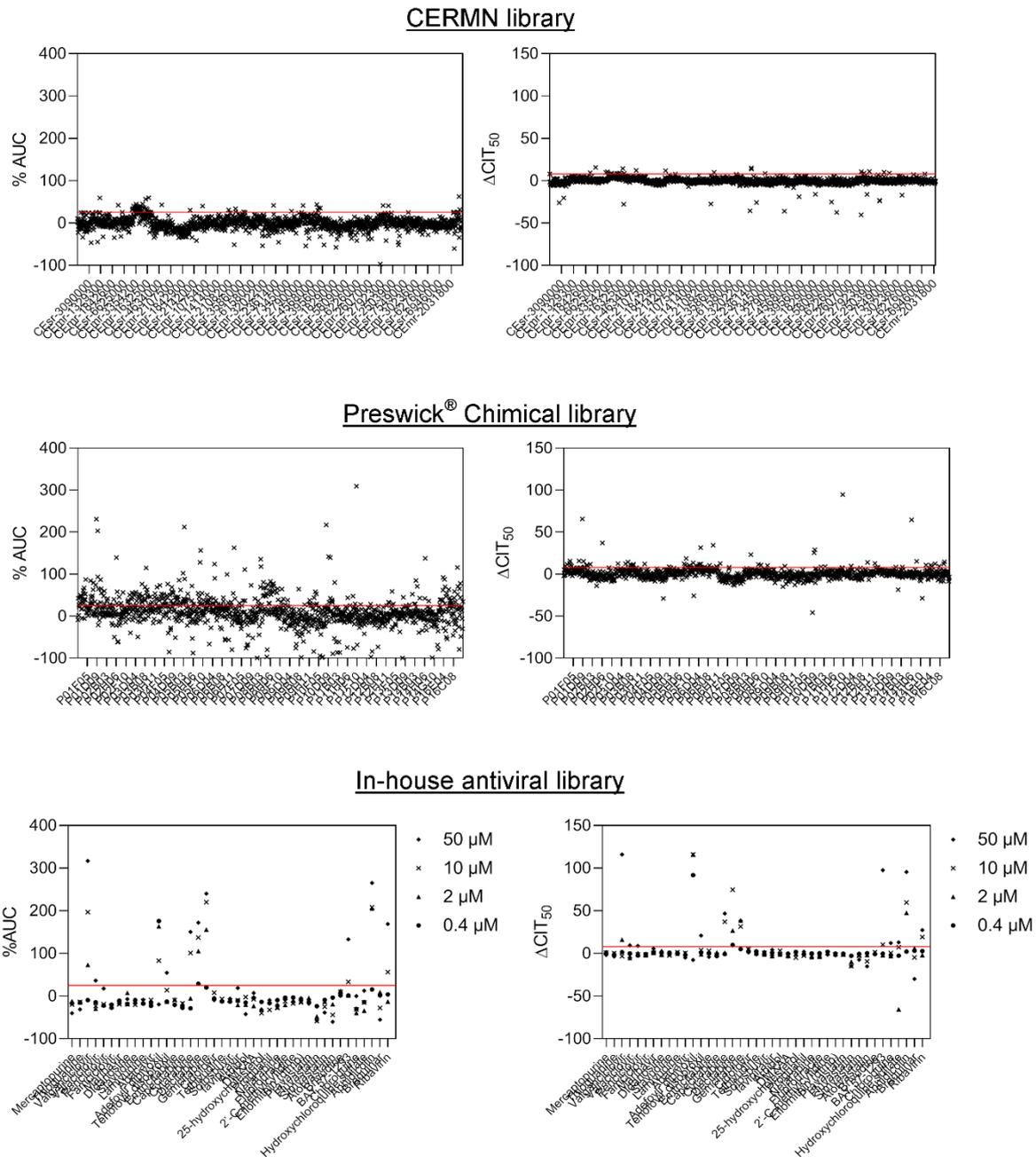
References

- Allen, G.P., Kydd, J.H., Slater, J.D., Smith, K.C., 2004. Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infectious. In: Coetzer, J.A.W., Tustin, R.C. (Eds.), *Infectious Diseases of Livestock*, 2nd edn. Oxford Press, Cape Town, pp. 829–859.
- Atallah, E., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., 2007. The role of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Opin. Pharmacother.* 8, 65–73. <https://doi.org/10.1517/14656566.8.1.65>.
- Azab, W., Tsujimura, K., Kato, K., Arai, J., Morimoto, T., Kawaguchi, Y., Tohya, Y., Matsumura, T., Akashi, H., 2010. Characterization of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 4 and *in vitro* susceptibility of the virus to antiviral agents. *Antivir. Res.* 85, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.007>.
- Berg, T., Notttrup, T.J., Roed, H., 2019. Gemcitabine for recurrent ovarian cancer - a systematic review and meta-analysis. *Gynecol. Oncol.* 155, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.09.026>.
- Betz, U.A.K., Fischer, R., Kleymann, G., Hendrix, M., Rubsam-Waigmann, H., 2002. Potent *in vivo* antiviral activity of the herpes simplex virus primase-helicase inhibitor BAY 57-1293. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1766–1772. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1766-1772.2002>.
- Carmichael, R.J., Whitfield, C., Maxwell, L.K., 2013. Pharmacokinetics of ganciclovir and valganciclovir in the adult horse. *J. Vet. Pharmacol. Therapeut.* 36, 441–449. <https://doi.org/10.1111/jvp.12029>.
- Chou, T.-C., Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzym. Regul.* 22, 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4).
- De Clercq, E., 1984. The antiviral spectrum of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *J. Antimicrob. Chemother.* 14, 85–95.
- De Clercq, E., Li, G., 2016. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>.
- de la Fuente, R., Awan, A.R., Field, H.J., 1992. The acyclic nucleoside analogue penciclovir is a potent inhibitor of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in tissue culture and in a murine model. *Antivir. Res.* 18, 77–89.
- Denisova, O.V., Kakkola, L., Feng, L., Stenman, J., Nagaraj, A., Lampe, J., Yadav, B., Aittokallio, T., Kaukinen, P., Ahola, T., Kuivaniemi, S., Vapalahti, O., Kantele, A., Tynell, J., Julkunen, I., Kallio-Kokko, H., Paavilainen, H., Hukkanen, V., Elliott, R. M., De Brabander, J.K., Saelens, X., Kainov, D.E., 2012. Obatoclax, Saliphenylhalamide, and gemcitabine inhibit Influenza A virus infection. *J. Biol. Chem.* 287, 35324–35332.
- Drouot, E., Piret, J., Boivin, G., 2016. Artesunate demonstrates *in vitro* synergism with several antiviral agents against human cytomegalovirus. *Antivir. Ther.* 21, 535–539. <https://doi.org/10.3851/IMP3028>.
- Fang, Y., Ye, P., Wang, X., Xu, X., Reisen, W., 2011. Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *J. Virol. Methods* 173, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.013>.
- Feng, J.Y., Ly, J.K., Myrick, F., Goodman, D., White, K.L., Svarovskaia, E.S., Borroto-Esoda, K., Miller, M.D., 2009. The triple combination of tenofovir, emtricitabine and efavirenz shows synergistic anti-HIV-1 activity *in vitro*: a mechanism of action study. *Retrovirology* 6, 44. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-44>.
- Ferreira, C.G.T., Campos, M.G., Felix, D.M., Santos, M.R., Carvalho, O.V. de, Diaz, M.A. N., Fietto, J.L.R., Bressan, G.C., Silva-Júnior, A., Almeida, M.R. de, 2018. Evaluation of the antiviral activities of Bacharis dracunculifolia and quercetin on Equid herpesvirus 1 in a murine model. *Res. Vet. Sci.* 120, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.09.001>.
- Friday, P.A., Scarratt, W.K., Elvinger, F., Timoney, P.J., Bonda, A., 2000. Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 197–201.
- Garre, B., Gryspeerdt, A., Croubels, S., De Backer, P., Nauwynck, H., 2009. Evaluation of orally administered valaciclovir in experimentally EHV-1-infected ponies. *Vet. Microbiol.* 135, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.062>.
- Garre, B., Vandermeulen, K., Nugent, J., Neyts, J., Croubels, S., Debacker, P., Nauwynck, H., 2007. *In vitro* susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. *Vet. Microbiol.* 122, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.004>.
- Gibson, J.S., 1992. The activity of (S)-l-[(3-hydroxy-2-phosphonyl methoxy) propyl] cytosine (HPMPC) against equine herpesvirus-1 (EHV-1) in cell cultures, mice and horses. *Antivir. Res.* 19, 219–232.
- Glorieux, S., Vandekerckhove, A.P., Goris, N., Yang, X.-Y., Steukers, L., Van de Walle, G. R., Croubels, S., Neyts, J., Nauwynck, H.J., 2012. Evaluation of the antiviral activity of (1'S,2'R)-9-[1',2'-bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-yl]methyl]guanine (A-5021) against equine herpesvirus type 1 in cell monolayers and equine nasal mucosal explants. *Antivir. Res.* 93, 234–238. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.11.016>.
- Goodman, L.B., Loregian, A., Perkins, G.A., Nugent, J., Buckles, E.L., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palù, G., Smith, K.C., Osterrieder, N., Davis-Poynter, N., 2007. A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog.* 3, e160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030160>.

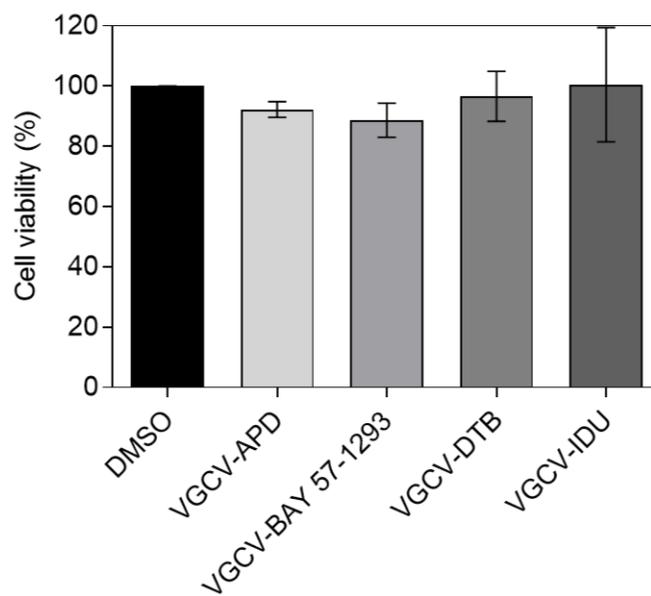
- Gravina, H.D., Tafuri, N.F., Silva Júnior, A., Fietto, J.L.R., Oliveira, T.T., Díaz, M.A.N., Almeida, M.R., 2011. In vitro assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1. *Res. Vet. Sci.* 91, e158–e162. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.11.010>.
- Halbrook, C.J., Pontious, C., Kovalenko, I., Lapienyte, L., Dreyer, S., Lee, H.-J., Thurston, G., Zhang, Y., Lazarus, J., Sajjakulnukit, P., Hong, H.S., Kremer, D.M., Nelson, B.S., Kemp, S., Zhang, L., Chang, D., Biankin, A., Shi, J., Frankel, T.L., Crawford, H.C., Morton, J.P., Pasca di Magliano, M., Lysiotis, C.A., 2019. Macrophage-released pyrimidines inhibit gemcitabine therapy in pancreatic cancer. *Cell Metabol.* 29, 1390–1399. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.001> e6.
- He, P.-F., Zhou, J.-D., Yao, D.-M., Ma, J.-C., Wen, X.-M., Zhang, Z.-H., Lian, X.-Y., Xu, Z.-J., Qian, J., Lin, J., 2017. Efficacy and safety of decitabine in treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8, 41498–41507. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17241>.
- Heminger, R.W., Reed, S.M., Saville, W.J., Allen, G.P., Hass, G.F., Kohn, C.W., Sofaly, C., 2007. Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university Equestrian center. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 157–165.
- James, S., Larson, K., Acosta, E., Prichard, M., 2015. Helicase-primase as a target of new therapies for herpes simplex virus infections. *Clin. Pharmacol. Ther.* 97, 66–78. <https://doi.org/10.1002/cpt.3>.
- Jiang, Y.-C., Feng, H., Lin, Y.-C., Guo, X.-R., 2016. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *Int. J. Oral Sci.* 8, 1–6.
- Jourdan, J., Bureau, R., Rochais, C., Dallemagne, P., 2020. Drug repositioning: a brief overview. *J. Pharm. Pharmacol. jphp.* 13273 <https://doi.org/10.1111/jphp.13273>.
- Kit, S., Ichimura, H., De Clercq, E., 1987. Phosphorylation of nucleoside analogs by equine herpesvirus type 1 pyrimidine deoxyribonucleoside kinase. *Antivir. Res.* 7, 53–67. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(87\)90039-8](https://doi.org/10.1016/0166-3542(87)90039-8).
- Kleymann, G., Fischer, R., Betz, U.A.K., Hendrix, M., Bender, W., Schneider, U., Handke, G., Eckenberg, P., Hewlett, G., Pevzner, V., Baumeister, J., Weber, O., Henninger, K., Keldenich, J., Jensen, A., Kolb, J., Bach, U., Popp, A., Mäben, J., Frappa, I., Haebich, D., Lockhoff, O., Rübsamen-Waigmann, H., 2002. New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat. Med.* 8, 392–398. <https://doi.org/10.1038/nm0402-392>.
- Léon, A., Fortier, C., Fortier, C., Freymuth, F., Tapprest, J., Leclercq, R., Pronost, S., 2008. Detection of equine herpesviruses in aborted foetuses by consensus PCR. *Vet. Microbiol.* 126, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.019>.
- Liu, Z., Liu, S., Xie, Z., Blum, W., Perrotti, D., Paschka, P., Klisovic, R., Byrd, J., Chan, K.K., Maruccci, G., 2007. Characterization of in vitro and in vivo hypomethylating effects of decitabine in acute myeloid leukemia by a rapid, specific and sensitive LC-MS/MS method. *Nucleic Acids Res.* 35 <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1156> e31–e31.
- Lunn, D.P., Davis-Poynter, N., Flaminio, M.J.B.F., Horohov, D.W., Osterrieder, K., Pusterla, N., Townsend, H.G.G., 2009. Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 450–461. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x>.
- Maggs, D.J., Clarke, H.E., 2004. In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine, and acyclovir against feline herpesvirus type-1. *Am. J. Vet. Res.* 65, 399–403. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.399>.
- Maxwell, L.K., 2017. Antihherpetic drugs in equine medicine. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* 33, 99–125. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.12.002>.
- Maxwell, L.K., Bentz, B.G., Bourne, D.W.A., Erkert, R.S., 2008. Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse. *J. Vet. Pharmacol. Therapeut.* 31, 312–320. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x>.
- Momparler, R.L., 2005. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Hematol.* 42, S9–S16. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2005.05.002>.
- Murray, M.J., Piero, F., Jeffrey, S.C., Davis, M.S., Furr, M.O., Dubovi, E.J., Mayo, J.A., 1998. Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. *J. Vet. Intern. Med.* 12, 36–41. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1998.tb00494.x>.
- Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K.C., Mumford, J.A., Swann, Z., Newton, J.R., Bowden, R.J., Allen, G.P., Davis-Poynter, N., 2006. Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J. Virol.* 80, 4047–4060. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006>.
- Paillot, R., Sutton, G., Thieulent, C., Marcillaud-Pitel, C., Pronost, S., 2020. New EHV-1 variant identified. *Vet. Rec.* 186, 573.
- Pan, T., Huang, B., Zhang, W., Gabos, S., Huang, D.Y., Devendran, V., 2013. Cytotoxicity assessment based on the AUC50 using multi-concentration time-dependent cellular response curves. *Anal. Chim. Acta* 764, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.047>.
- Piret, J., Goyette, N., Boivin, G., 2016. Novel method based on real-time cell analysis for drug susceptibility testing of herpes simplex virus and human cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2120–2127. <https://doi.org/10.1128/JCM.03274-15>.
- Price, N.B., Prichard, M.N., 2011. Progress in the development of new therapies for herpesvirus infections. *Curr. Opin. Virol.* 1, 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.015>.
- Prichard, M.N., Shipman, C., 1990. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. *Antivir. Res.* 14, 181–206.
- Pronost, S., Léon, A., Legrand, L., Fortier, C., Miszczak, F., Freymuth, F., Fortier, G., 2010. Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Vet. Microbiol.* 145, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.031>.
- Rollinson, E.A., 1987. Comparative efficacy of three 2'-fluoropyrimidine nucleosides and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine (BW B759U) against pseudorabies and equine rhinopneumonitis virus infection in vitro and in laboratory animals. *Antivir. Res.* 7, 25–33. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(87\)90036-2](https://doi.org/10.1016/0166-3542(87)90036-2).
- Schmelz, K., Sattler, N., Wagner, M., Lübbert, M., Dörken, B., Tamm, I., 2005. Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms. *Leukemia* 19, 103–111. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403552>.
- Shin, H., Kim, C., Cho, S., 2018. Gemcitabine and nucleos(t)ide synthesis inhibitors are broad-spectrum antiviral drugs that activate innate immunity. *Viruses* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3390/v10040211>.
- Smith, K.L., Allen, G.P., Branscum, A.J., Frank Cook, R., Vickers, M.L., Timoney, P.J., Balasuriya, U.B.R., 2010. The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Vet. Microbiol.* 141, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.030>.
- Stresmann, C., Lyko, F., 2008. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacitidine and decitabine. *Int. J. Canc.* 123, 8–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.23607>.
- Sullivan, V., Talarico, C.L., Stanat, S.C., Davis, M., Coen, D.M., Biron, K.K., 1992. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* 358, 162–164.
- Sutton, Garvey, Cullinane, A., Jourdan, M., Fortier, C., Moreau, P., Foursin, M., Gryspeerdt, A., Maisonnier, V., Marcillaud-Pitel, C., Legrand, L., Paillot, Pronost, 2019. Molecular surveillance of EHV-1 strains circulating in France during and after the major 2009 outbreak in Normandy involving respiratory infection, neurological disorder, and abortion. *Viruses* 11, 916. <https://doi.org/10.3390/v11100916>.
- Tallmadge, R.L., Žygeltyė, E., Van de Walle, G.R., Kristie, T.M., Felipe, M.J.B., 2018. Effect of a histone demethylase inhibitor on equine herpesvirus-1 activity in vitro. *Front. Vet. Sci.* 5 <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00034>.
- 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., 2019. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology* 526, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.013>.
- Vissani, M.A., Thiry, E., Dal Pozzo, F., Barrandeguy, M., 2016. Antiviral agents against equid alphaherpesviruses: current status and perspectives. *Vet. J.* 207, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.010>.
- Wang, J., Li, A., Jin, M., Zhang, F., Li, X., 2016. Dual-modality imaging demonstrates the enhanced antitumoral effect of herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir plus gemcitabine combination therapy on cholangiocarcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine* 12, 183–189. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3294>.
- Williams, S.L., Hartline, C.B., Kushner, N.L., Harden, E.A., Bidanset, D.J., Drach, J.C., Townsend, L.B., Underwood, M.R., Biron, K.K., Kern, E.R., 2003. In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2186–2192. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2186-2192.2003>.
- Zhang, J.-H., Chung, T.D.Y., Oldenburg Kevin, R., 1999. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen* 4, 67–73.

Supplementary Table 1: Library of selected compounds for their antiviral effects on different families of viruses.

Compounds	Suppliers	Catalogue no.
2'-C-methylcytidine	Ark Pharm, Inc.	AK-88474
25-hydroxycholesterol	Cayman Europe	11097
Abacavir	TargetMol	T6367
Adefovir dipivoxil	TargetMol	T1675
Aphidicolin	Santa Cruz Biotechnologies	Sc-201535
Arbidol	TargetMol	T0104
Atorvastatin	Sigma	PZ0001
Brequinar	Adooq Bioscience	A12442
Brivudine	MedChemExpress	HY-13578
Capecitabine	TargetMol	T1408
Chloroquine	Sigma	C6628
Cidofovir	TargetMol	T6244
Cytarabine	TargetMol	T1272
Decitabine	TargetMol	T1508
Didanosine	TargetMol	T2578
DMXAA	TargetMol	T6273
Eflornithin (dfmo)	Sigma	D193
Emtricitabine	TargetMol	T6214
Famciclovir	TargetMol	T1646
Favipiravir	TargetMol	T6833
Fluorouracile	AK Scientific, Inc.	Ak-67526
Fluvastatin	Sigma	SML0038
Gemcitabine	TargetMol	T0251
Hydroxychloroquine sulfate	MedChemExpress	HY-B1370
Lamivudine	TargetMol	T0682
Maribavir	TargetMol	T2162
Mercaptopurine	TargetMol	T0010
Nelarabine	AK Scientific, Inc.	R077
Penciclovir	TargetMol	T1643
Pravastatin	Sigma	P4498
Pritelivir (BAY 57-2193)	MedChemExpress	HY-15303
Proguanil	BIONET / Key Organics Ltd.	HS-0102
Ribavirin	MedChemExpress	HY-B0434
Simvastatin	Sigma	S6196
Sofosbuvir	TargetMol	T6676
Stavudine	TargetMol	T1404
Telbivudine	TargetMol	T1513
Tenofovir disoproxil	TargetMol	T2409
Thioguanine	TargetMol	T3089
Valaciclovir	TargetMol	T1087
Valganciclovir	TargetMol	T1533



Supplementary Figure 1: Screening of 2,891 chemical compounds in order to identify EHV-1 inhibitors. CERMN library was screened at 10 μM , Prestwick® Chemical library was screened at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and in-house antiviral library were screened at 4 concentrations (0.4, 2, 10 and 50 μM). For each library, the percentage of area under normalised Cell Index (CI) from 0 to 96 hpi of treated cells compared to mock-treated cells (%AUC) and the increase of the time required for the CI to decrease by 50% after virus infection (CIT_{50}) of treated cells compared to mock-treated cells (ΔCIT_{50}) were reported graphically. Compounds allowing an increase of the AUCn by 25% (red line) and a delay of the CIT_{50} by >8 h (red line) as compared to non-treated cells were identified as potential antiviral compounds against EHV-1.



Supplementary Figure 2: Cytotoxicity assay of combinations on equine dermal cells. Toxicity evaluation is measured by luminescence assays using CellTiter-Glo® kit. Histogram represents the percentage viability of E. Derm cells treated with the highest concentration of compounds compared to mock-treated cells. Each data corresponds to mean \pm SD of three independent experiments.

2.3. Article 3

Article Title

Screening of potential antiviral molecules against equid herpesvirus-1 using cellular impedance measurement: dataset of 2,891 compounds.

Authors

Côme Thieulent^{1,2}, Christine Fortier^{1,2,3}, Hélène Munier-Lehmann⁴, Peggy Suzanne⁵, Patrick Dallemagne⁵, Stephan Zientara⁶, Aymeric Hans⁷, Romain Paillot^{1,2}, Pierre-Olivier Vidalain^{8,9}, Stéphane Pronost^{1,2,3} and Erika Hue^{1,2,3}

Affiliations

1. LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France.
2. Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450, 14280 Saint-Contest, France.
3. Normandie Univ, UNICAEN, ImpedanCELL, 14280 Saint-Contest, France.
4. Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, CNRS UMR 3523, 75015 Paris, France.
5. Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, 14000 Caen, France.
6. Université Paris-Est, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, INRA, ENVA, UMR 1161 Virologie, 94700 Maisons-Alfort, France.
7. ANSES, Laboratoire de pathologie équine de Dozulé, Unité de virologie et parasitologie équine, 14430 Dozulé, France.
8. CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, F-69007, Lyon, France.
9. Equipe Chimie et Biologie, Modélisation et Immunologie pour la Thérapie (CBMIT), Université Paris Descartes, CNRS UMR 8601, 75006 Paris, France.

Corresponding author(s)

Erika Hue (erika.hue@laboratoire-labeo.fr)

Abstract

Data presented in this article are associated with the research article "Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: efficacy of decitabine and valganciclovir alone and in combination" (Thieulent et al., *Antiviral research, in press* [1]). These data correspond to the *in vitro* screening of 2,891 potential antiviral compounds against equid herpesvirus-1 (EHV-1) based on impedance measurements using the xCELLigence[ ] RTCA MP System. This dataset includes compounds from three different libraries: i) 1,199 compounds from the Prestwick[ ] Chemical Library, which contains mostly US Food and Drug Administration approved drugs (Prestwick[ ] Chemical, Illkirch, France); ii) 1,651 compounds from the Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN, Caen, France); iii) 41 compounds (called herein in-house antiviral library) selected for their effects against different human viruses. Compounds effective against EHV-1 were selected using the area under normalised curves (AUC_n) and the time required for the Cell Index to decrease by 50% after virus infection (CIT₅₀). The full dataset from the screen is made publicly available for further analyses.

Keywords

Real-time cell assay; Chemical library screening; Antiviral; Equid herpesvirus-1

Specifications Table

Subject	Virology, Biology
Specific subject area	Antiviral compounds tested against equid herpesvirus-1
Type of data	Table (online table) Figure
How data were acquired	The antiviral screening dataset of compounds against equid herpesvirus-1 was acquired using impedance measurements with xCELLigence® RTCA MP system (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA). Data were analysed with RTCA software 2.0 and Microsoft Excel (v. 2010, Microsoft Corporation, Washington, USA).
Data format	Analysed data: Microsoft Excel Analysed data: figure
Parameters for data collection	Equine dermal fibroblasts were infected with the EHV-1 Kentucky D (KyD) strain (ATCC® VR700™) at a MOI of 0.01 and incubated at 37 °C and 5% CO ₂ in the presence of tested compounds. This study includes 2,891 compounds from three different libraries: i) 1,199 compounds from the Prestwick® Chemical Library, which contains mostly US Food and Drug Administration approved drugs (Prestwick Chemical, Illkirch, France); ii) 1,651 compounds from the Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN, Caen, France); iii) 41 compounds (called herein in-house antiviral library) selected for their effects against different human viruses. The screening by impedancemetry was performed on EHV-1 KyD-infected E. Derm cells as a model and using the RTCA MP system (ACEA Biosciences Inc.) as previously described by Thieulent et al., 2019 [2]. The area under normalised curves (AUC _n) and the time required for the Cell Index to decrease by 50% after virus infection (CIT ₅₀) were analysed with RTCA software 2.0 and Microsoft Excel (v. 2010, Microsoft Corporation, Washington, USA).
Description of data collection	All data collected originate from impedance measurements during antiviral assays against EHV-1 using the xCELLigence® RTCA MP system (ACEA Biosciences Inc). According to the manufacturer's recommendations, CI values were first normalised to match the last time point before cell infection using the RTCA software version 2.0 (ACEA

	Biosciences) prior to data analysis. Finally, four representative values were calculated for each culture conditions: area under normalised curves (AUC _n ; [3]), % AUC compared to control cells, time required for the CI to decrease by 50% after virus infection (CIT ₅₀ ; [4]) and Delta CIT ₅₀ . The quality of the screening in 96-well format was assessed using the Z'-factor calculation ([5]) based on AUC _n values between 0 and 120 h post-infection (hpi).
Data source location	Institution: LABÉO, Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450, ImpedanCELL City/Town/Region: Saint-Conest Country: France Latitude and longitude (and GPS coordinates, if possible) for collected samples/data: 49.201981, -0.395943
Data accessibility	The dataset is available with this article.
Related research article	C. Thieulent, E. Hue, G. Sutton, C. Fortier, P. Dallemagne, S. Zientara, H. Munier-Lehmann, A. Hans, R. Paillot, P-O. Vidalain, S. Pronost, Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: efficacy of decitabine and valganciclovir alone and in combination, <i>Antiviral res. In Press</i> . [1]

Value of the Data

- The dataset describes the antiviral activity of 2,891 compounds against equid herpesvirus-1 (EHV-1) and completes the limited number of active molecules previously described.
- These data would help research of antiviral compounds, especially against herpesviruses.
- These data may influence the development or the repositioning of compounds against herpesviruses.
- This method of medium/high-throughput screening and analysis can be adapted to identify antiviral compounds effective against multiple other viruses.
- The dataset is related to an equid herpesvirus but could be informative to viruses infecting other animal species, including humans, as part of the One-Health concept.

Data Description

Results from the screen are presented in Table 1, 2 and 3. For each compound, we provide the area under normalised Cell Index curve from 0 to 96 hpi (AUC_n), the %AUC compared to AUC of untreated, EHV-1-infected control wells, the time required for the cell index to decrease by 50% after virus infection (CIT₅₀)

and the ΔCIT_{50} value obtained by comparing results for treated vs untreated, EHV-1-infected control wells. The Z'-factor reflects the quality of the screening in 96-well format. Table 1 shows the values obtained with the 1,199 compounds from the Prestwick® Chemical Library, containing mostly US Food and Drug Administration approved drugs (Prestwick Chemical, Illkirch, France). Table 2 shows the values obtained with the 1,651 compounds from the Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN, Caen, France). Table 3 shows the values obtained with the 41 compounds (called herein in-house antiviral library) selected for their effects against different human viruses. Data shown in Fig. 1 correspond to %AUC and ΔCIT_{50} values for individual compounds from each library.

Experimental Design, Materials and Methods

1. Cell line and EHV-1 strain

Equine dermal fibroblasts (E. Derm, NBL-6 ATCC® CCL-57, Manassas, VA) were cultivated in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM; ATCC®) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, Courtaboeuf, France), 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin B (Eurobio) at 37 °C and 5% CO₂.

Cells were infected with the EHV-1 Kentucky D (KyD) strain (ATCC® VR700™) at a MOI of 0.01 for the screening.

2. Compounds

This study includes 2,891 compounds from three different libraries: i) 1,199 compounds from the Prestwick® Chemical Library, containing mostly US Food and Drug Administration approved drugs (Prestwick Chemical, Illkirch, France) provided at 2 mg/mL in DMSO; ii) 1,651 compounds from the Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN, Caen, France) provided at 10 mM in DMSO; iii) 41 compounds (called herein in-house antiviral library) selected for their effects against different human viruses and dissolved at 10 mM in DMSO.

3. Screening of compound libraries using the RTCA system

The screening by impedancemetry was monitored using the RTCA MP system (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA), with 6 independent positions for 96-well E-plates (ACEA Biosciences) as previously described [2]. The impedance signal measured by the electronic sensor analyser were derived in a dimensionless value, called Cell Index (CI) and graphically represented.

The background readings were obtained with EMEM supplemented in each well of the E-plate view PET (ACEA Biosciences). Cells were then seeded at a density of 1.2×10^4 per well (adapted from [6]), incubated at room temperature for 30 min, and then placed onto the RTCA-MP station located in the incubator. CI values were measured automatically every minute during the first 10 hours, and then every 15 minutes for the next 14 hours.

After 24 hours of incubation, medium was removed and cells were infected with EHV-1 KyD strain at a MOI of 0.01 with or without chemical compounds. Control cells were treated with 0.5% DMSO in presence or absence of the virus. Plates were put back onto the RTCA MP station, and the CI values were recorded every

10 minutes during 120 hours. According to the manufacturer's recommendations, CI values were first normalised to match the last time point before cell infection using the RTCA software version 2.0 (ACEA Biosciences) prior to data analysis.

The screening was performed under blind conditions and 80 compounds were tested by plate at a final concentration of 10 µg/mL (Preswick® Chemical Library), 10 µM (CERMN library) or 50, 10, 2 and 0.4 µM (in-house antiviral library) in 0.5% DMSO. Each plate includes the controls required for calculation of the Z'-factor [5] based on AUC_n values between 0 and 120 h post-infection (hpi). The formula is: $Z' = 1 - 3 \times (\sigma_+ + \sigma_-) / (\mu_+ - \mu_-)$, where σ_+ and σ_- correspond to standard deviations of AUC_n for uninfected and infected cells with DMSO, respectively; and μ_+ and μ_- correspond to means of AUC_n for uninfected and infected cells with DMSO, respectively. Only plates with a Z' factor higher than 0.5 were considered for further analysis as previously described by Thieulent et al. (2019) [2]. According to the manufacturer's recommendations, CI values were first normalised to match the last time point before cell infection using the RTCA software version 2.0 (ACEA Biosciences) prior to data analysis. For each compound, the area under normalised Cell Index (CI) curves was calculated from 0 to 96 hours post-infection (hpi) (AUC_n; [3]). The %AUC was calculated with formula:

$\%AUC = \frac{(AUC_{\text{compound}} - AUC_{\text{untreated cells infected}})}{AUC_{\text{untreated cells infected}}} \times 100$. The time required for the CI to decrease by 50% after virus infection was also determined (CIT₅₀; [4]), and compared with untreated cells infected with EHV-1 KyD strain (Delta CIT₅₀ = CIT₅₀ compound - CIT₅₀ untreated cells infected).

Acknowledgments

This work was supported by LABÉO, IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation, project AMIE), Fonds Eperon (project N87-2014, N07-2015, N07-2016, N13-2017 and N62-2017), Région Normandie (CPER R25 P3) and CENTAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational programme 2014-2020. We thank Christophe Denoyelle and Emilie Brotin from ImpedanCELL, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France for interacting and for their technical assistance with RTCA technology. We also thank all collaborators of the SAVE project.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships which have, or could be perceived to have, influenced the work reported in this article.

References

- [1] C. Thieulent, E.S. Hue, G. Sutton, C.I. Fortier, P. Dallemagne, S. Zientara, H. Munier-Lehmann, A. Hans, R. Paillot, P.-O. Vidalain, S.L. Pronost, 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.* (in press).
- [2] C.J. Thieulent, E.S. Hue, C.I. Fortier, P. Dallemagne, S. Zientara, H. Munier-Lehmann, A. Hans, G.D. Fortier, P.-H. Pitel, P.-O. Vidalain, S.L. Pronost, Screening and evaluation of antiviral compounds against

Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay, *Virology*. 526 (2019) 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.013>.

[3] T. Pan, B. Huang, W. Zhang, S. Gabos, D.Y. Huang, V. Devendran, Cytotoxicity assessment based on the AUC50 using multi-concentration time-dependent cellular response curves, *Anal. Chim. Acta*. 764 (2013) 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.047>.

[4] Y. Fang, P. Ye, X. Wang, X. Xu, W. Reisen, Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology, *J. Virol. Methods*. 173 (2011) 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.013>.

[5] J.-H. Zhang, T.D.Y. Chung, K.R. Oldenburg, A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays, *J. Biomol. Screen*. 4 (1999) 67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>.

[6] D. Tian, W. Zhang, J. He, Y. Liu, Z. Song, Z. Zhou, M. Zheng, Y. Hu, Novel, Real-Time Cell Analysis for Measuring Viral Cytopathogenesis and the Efficacy of Neutralizing Antibodies to the 2009 Influenza A (H1N1) Virus, *PLoS ONE*. 7 (2012) e31965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031965>.

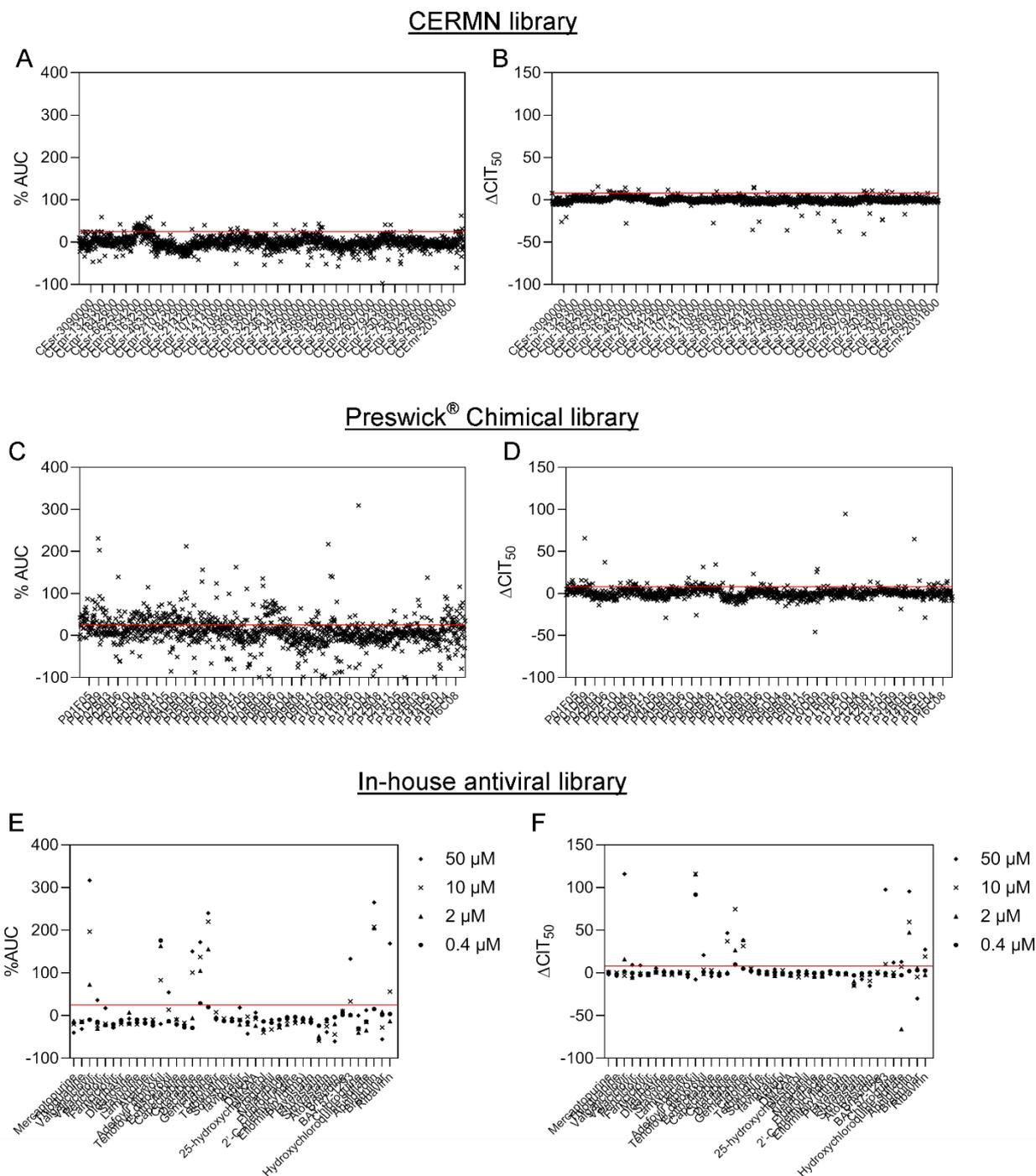


Figure 1: Dataset screening of 2,845 chemical compounds from three libraries to identify EHV-1 inhibitors. The CERMN library (A, B) was screened at 10 μM , Prestwick® Chemical library (C, D) at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and in-house antiviral library (E, F) at 4 concentrations (0.4, 2, 10 and 50 μM). The percentage of area under normalised Cell Index (CI) from 0 to 96 hpi of treated cells compared to mock-treated cells (%AUC) were reported graphically for each library. The red line represents the cut-off 25% from which compound could identified as potential antiviral compounds against EHV-1 (A, C, E). The increase of the time required for the CI to decrease by 50% after virus infection (ΔCIT_{50}) of treated cells compared to mock-treated cells were reported graphically for each library. The red line represents the cut-off 8 h of delay from which compound could identified as potential antiviral compounds against EHV-1 (B, D, F).

Table 1: Screening of 1,199 compounds from the Prestwick® Chemical Library, containing mostly US Food and Drug Administration approved drugs (Prestwick Chemical, Illkirch, France) at 10 µg/mL. For each compound, the following values are provided: the area under normalised Cell Index curve (AUC_n), the %AUC compared to AUC of untreated infected cells, the time required for the cell index to decrease by 50% after virus infection (CIT₅₀) and the ΔCIT₅₀ value obtained by comparing results for treated vs untreated, EHV-1-infected control wells. The Z'-factor was used to assess the quality of the screening in 96-well format. For untreated mock-infected and untreated infected cells, the mean ± SD of AUC is reported. *N.D., not determinable.*

Disponible dans la version électronique (Tableau de 23 pages)

Table 2: Screening of 1,651 compounds from the Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN, Caen, France) at 10 µM. For each compound, the following values are provided: the area under normalised Cell Index curve (AUC_n), the %AUC compared to AUC of untreated infected cells, the time required for the cell index to decrease by 50% after virus infection (CIT₅₀) and the ΔCIT₅₀ value obtained by comparing results for treated vs untreated, EHV-1-infected control wells. The Z'-factor was used to assess the quality of the screening in 96-well format. For untreated mock-infected and untreated infected cells, the mean ± SD of AUC is reported. *N.D., not determinable.*

Disponible dans la version électronique (Tableau de 32 pages)

Table 3: Screening of 41 compounds (in-house antiviral library) selected for their effects against different human viruses. For each compound, the following values are provided: the area under normalised Cell Index curve (AUCn), the %AUC compared to AUC of untreated infected cells, the time required for the cell index to decrease by 50% after virus infection (CT₅₀) and the ΔCT₅₀ value obtained by comparing results for treated vs untreated, EHV-1-infected control wells. The Z-factor was used to assess the quality of the screening in 96-well format. For untreated mock-infected and untreated infected cells, the mean ± SD of AUC is reported. *N.D., not determinable.*

Compound name	Supplier	Z'factor	AUC				%AUC				CT50				ΔCT50			
			50 µM	10 µM	2 µM	0.4 µM	50 µM	10 µM	2 µM	0.4 µM	50 µM	10 µM	2 µM	0.4 µM	50 µM	10 µM	2 µM	0.4 µM
A1 untreated mock-infected cells		0,74	156,79 ± 9,26				N.D.				N.D.				N.D.			
A1 untreated infected cells		0,74	57,08 ± 2,59				N.D.				31:52:27				N.D.			
Mercaptopurine	TargetMol	0,74	41,98	49,59	52,52	50,67	-39,72	-19,72	-12,00	-16,87	30:04:57	32:51:02	33:41:02	32:24:07	-1,76	1,01	1,84	0,56
Thioguanine	TargetMol	0,74	45,22	51,94	51,43	51,39	-31,22	-13,54	-14,86	-14,98	28:14:30	32:05:21	31:41:42	30:27:49	-3,60	0,24	-0,15	-1,38
Valganciclovir	TargetMol	0,74	177,47	131,87	84,84	53,52	316,71	196,74	73,03	-9,38	147:44:31	28:32:34	47:53:27	33:25:08	115,90	-3,30	16,05	1,57
Valaciclovir	TargetMol	0,74	70,89	48,32	45,80	51,60	36,33	-23,04	-29,68	-14,44	41:13:30	28:47:46	26:26:57	32:02:04	9,38	-3,05	-5,40	0,19
Peniclovir	TargetMol	0,74	63,88	49,84	49,04	48,81	17,89	-19,06	-21,16	-10,74	40:47:08	30:46:02	32:17:14	29:24:29	8,94	-1,08	0,44	-2,44
Famciclovir	TargetMol	0,74	46,39	48,66	47,51	49,39	-28,13	-22,16	-25,17	-20,23	29:21:08	30:34:39	29:56:22	31:01:37	-2,49	-1,27	-1,91	-0,82
Maribavir	TargetMol	0,74	51,30	49,71	51,46	53,00	-15,22	-19,40	-14,79	-10,74	37:21:43	32:49:24	32:38:31	32:55:22	5,52	0,98	0,80	1,08
Didanosine	TargetMol	0,74	54,52	49,67	60,00	49,97	-6,74	-19,52	7,68	-18,72	29:37:46	30:05:36	34:56:53	33:17:07	-2,22	-1,75	3,10	1,44
Stavudine	TargetMol	0,74	50,28	49,44	52,49	53,54	-17,89	-20,11	-12,08	-9,33	31:04:33	29:27:03	31:30:50	32:47:16	-0,77	-2,39	-0,33	0,94
Lamivudine	TargetMol	0,74	53,84	52,80	51,53	50,36	-8,52	-11,26	-14,60	-17,67	32:23:37	33:09:48	31:39:41	32:07:56	0,55	1,32	-0,18	0,29
Abacavir	TargetMol	0,74	50,57	53,67	52,64	48,42	-17,14	-8,99	-11,68	-22,80	26:56:17	32:21:46	32:27:26	29:59:41	-4,91	0,52	0,61	-1,85
Adefovir dipivoxil	TargetMol	0,74	49,71	88,67	119,24	123,95	-19,41	83,10	163,52	175,92	24:16:02	147:44:31	147:44:31	123:32:51	-7,58	115,90	115,90	91,70
Tenofovir disoproxil	TargetMol	0,74	77,88	62,32	52,05	52,19	54,70	13,76	-13,25	-12,87	52:52:57	35:46:29	30:56:57	33:05:05	21,04	3,93	-0,90	1,24
Emtricitabine	TargetMol	0,74	48,89	53,46	54,12	49,47	-21,56	-9,54	-7,78	-20,04	27:48:05	35:02:51	32:51:10	32:05:11	-4,04	3,20	1,01	0,24
Capcitabine	TargetMol	0,74	47,51	50,66	50,25	46,70	-25,17	-16,89	-17,99	-27,30	31:08:32	30:10:49	32:57:59	28:44:35	-0,70	-1,66	1,12	-3,10
Cytarabine	TargetMol	0,74	114,38	95,55	55,16	46,30	150,72	101,19	-5,05	-28,36	78:35:53	69:03:43	32:45:25	31:02:17	46,75	37,22	0,91	-0,81
Decitabine	TargetMol	0,74	122,51	109,26	97,17	68,10	172,12	137,26	105,46	28,98	42:05:06	106:37:57	58:35:58	41:39:02	10,24	74,79	26,75	9,81
A2 untreated mock-infected cells		0,73	146,42 ± 9,06				N.D.				N.D.				N.D.			
A2 untreated infected cells		0,73	38,01 ± 3,00				N.D.				33:04:09				N.D.			
Gemcitabine	TargetMol	0,73	129,33	121,67	97,34	45,70	240,22	220,08	156,07	20,23	69:52:01	63:04:07	70:06:21	36:30:58	38,38	31,58	38,62	5,03
Cidofovir	TargetMol	0,73	34,46	41,04	36,73	35,92	-9,35	7,98	-3,37	-5,49	32:43:20	36:28:21	36:30:37	33:49:02	1,23	4,98	5,02	2,33
Telbivudine	TargetMol	0,73	34,09	35,57	33,98	33,41	-10,31	-6,43	-10,62	-12,10	30:24:48	31:52:08	33:40:39	33:54:47	-1,08	0,38	2,19	2,42
Sofosbuvir	TargetMol	0,73	35,77	34,00	34,62	33,15	-5,89	-10,55	-8,92	-12,78	33:19:36	32:03:00	30:19:53	30:46:50	1,84	0,56	-1,16	-0,71
Favipiravir	TargetMol	0,73	45,22	34,29	30,23	34,02	18,95	-9,79	-20,47	-10,50	35:46:39	30:56:40	28:26:22	32:07:41	4,29	-0,55	-3,05	0,64
Arbidol	TargetMol	0,73	21,90	37,15	30,50	32,27	-42,38	-2,28	-19,77	-15,10	29:57:22	34:39:23	30:17:39	30:33:03	-1,53	3,17	-1,20	-0,94
DMXAA	TargetMol	0,73	40,75	35,18	29,18	36,33	7,19	-7,45	-23,23	-4,42	27:48:47	28:31:30	29:32:20	31:11:59	-3,68	-2,96	-1,95	-0,29
25-hydroxycholesterol	Cayman Europe	0,73	26,08	22,82	26,23	32,94	-31,40	-39,98	-31,00	-13,36	32:01:30	26:34:31	31:03:54	33:18:11	0,53	-4,91	-0,43	1,81
Proguanil	BIONET / Key Organics Ltd.	0,73	34,42	25,80	33,49	31,77	-9,44	-32,12	-11,89	-16,43	33:44:21	28:58:16	32:57:16	30:15:33	2,25	-2,52	1,46	-1,23
Nelarabine	AK Scientific, Inc.	0,73	30,10	27,45	28,15	34,38	-20,82	-27,77	-25,95	-9,56	29:56:14	28:35:11	27:17:35	31:39:20	-1,55	-2,90	-4,20	0,17
Fluorouracil	AK Scientific, Inc.	0,73	35,76	33,34	30,24	36,59	-5,91	-12,29	-20,44	-3,74	28:55:46	28:58:17	27:42:45	31:51:42	-2,56	-2,52	-3,78	0,37
Z'-C-methylcytidine	Ark Phar, Inc.	0,73	32,38	31,50	34,42	36,75	-14,82	-17,12	-9,45	-3,33	30:04:02	31:56:57	31:51:26	33:33:39	-1,42	0,46	0,37	2,07
Eflornithin (dfmo)	Sigma	0,73	36,12	32,43	33,31	34,90	-4,99	-14,68	-12,37	-8,18	29:22:23	30:34:14	31:31:43	31:13:14	-2,12	-0,92	0,04	-0,27
Pravastatin	Sigma	0,73	31,27	33,45	36,29	32,66	-17,73	-11,99	-4,54	-14,09	29:58:56	29:52:34	30:38:38	31:06:08	-1,51	-1,61	-0,85	-0,39
Fluvastatin	Sigma	0,73	16,39	15,74	19,93	29,11	-56,89	-58,58	-47,57	-23,41	16:48:54	16:34:24	21:53:32	28:40:01	-14,67	-14,92	-9,60	-2,82
Simvastatin	Sigma	0,73	23,44	28,62	33,11	34,55	-38,34	-24,72	-12,89	-9,11	24:01:37	28:39:11	29:49:59	31:03:16	-7,46	-2,84	-1,66	-0,44
Atorvastatin	Sigma	0,73	15,15	21,30	30,83	36,62	-60,13	-43,97	-18,89	-3,67	16:19:45	22:17:20	29:43:25	31:49:47	-15,16	-9,20	-1,77	0,34
A3 untreated mock-infected cells		0,7	136,03 ± 11,19				N.D.				N.D.				N.D.			
A3 untreated infected cells		0,7	49,72 ± 1,34				N.D.				31:53:38				N.D.			
Brivudine	MedChemExpress	0,7	53,56	53,58	54,40	50,35	10,10	10,15	12,32	1,68	32:17:37	33:47:56	33:09:00	31:41:08	-0,13	1,38	0,73	-0,74
BAY 57-1293	MedChemExpress	0,7	100,32	62,45	50,45	50,31	133,13	33,49	1,94	1,57	130:02:11	42:46:56	30:20:20	32:00:42	97,61	10,36	-2,08	-0,41
A4 untreated mock-infected cells		0,61	147,97 ± 5,78				N.D.				N.D.				N.D.			
A4 untreated infected cells		0,61	55,26 ± 5,74				N.D.				45:06:29				N.D.			
Chloroquine	Sigma	0,61	55,41	43,43	40,23	43,76	0,40	-31,11	-39,53	-30,26	57:21:37	45:32:25	42:11:31	43:08:51	12,25	0,43	-2,92	-1,96
Hydroxychloroquine sulfate	MedChemExpress	0,61	60,03	49,60	42,39	49,96	12,55	-14,90	-33,85	-13,95	58:09:18	52:26:41	40:18:29	42:33:29	13,05	7,34	-65,58	-2,55
A5 untreated mock-infected cells		0,66	149,38 ± 8,96				N.D.				N.D.				N.D.			
A5 untreated infected cells		0,66	53,33 ± 7,05				N.D.				42:10:51				N.D.			
Aphidicolin	Santa Cruz Biotechnology	0,66	154,19	132,47	131,57	59,30	265,34	208,20	205,81	15,71	137:40:02	103:18:19	91:15:23	45:44:20	95,49	59,69	47,64	2,12
A6 untreated mock-infected cells		0,78	29,88 ± 4,16				N.D.				N.D.				N.D.			
A6 untreated infected cells		0,78	109,64 ± 4,03				N.D.				30:12:49				N.D.			
Brequinar	Adooq Bioscience	0,78	8,93	19,30	33,42	30,61	-55,11	-27,84	9,33	1,94	0:22:31	25:28:27	36:12:01	33:25:59	-29,84	-4,74	5,99	3,22
Ribavirin	MedChemExpress	0,78	94,17	51,39	25,11	31,45	169,13	56,60	-12,55	4,13	57:34:04	49:31:47	28:18:30	32:55:08	27,35	19,32	-1,91	2,71

2.4. Résultats et discussion

Au cours de cette étude, 2 891 molécules ont été criblées *in vitro* sur cellules ED contre l'HVE-1 en utilisant la mesure d'impédance cellulaire avec la technologie xCELLigence®. L'ensemble des données du criblage sera libre d'accès pour l'ensemble de la communauté scientifique après la publication de l'article 3 qui permettra de présenter l'étude de manière tout à fait exhaustive.

Parmi l'ensemble des 2 891 molécules criblées, 21 ont présenté un effet antiviral contre l'HVE-1 sur cellules ED avec une efficacité satisfaisante. La bonne corrélation observée entre les EC₅₀ déterminées par xCELLigence® et qPCR ($r = 0,81$) confirme la pertinence d'utiliser la mesure par impédancemétrie pour évaluer l'effet de molécules antivirales. Parmi ces 21 molécules, seules huit ont été retenues à partir des critères discriminants suivants : i) absence de cytotoxicité à 50 μM ($\text{CC}_{50} > 50 \mu\text{M}$) et ii) $\text{EC}_{50} < 50 \mu\text{M}$ au cours du temps. Il s'agit de l'ACV, l'aphidicoline, la décitabine (DTB), du GCV, la gemcitabine, l'idoxuridine, du pritelivir (BAY 57-1293) et du valganciclovir (VGCV). Ces huit composés ont été testés contre trois souches d'HVE-1 présentant les 3 mutations connues en position 2254 de l'ADN polymérase virale (A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ et C₂₂₅₄). Aucune différence de sensibilité n'est observée entre ces souches avec ces différents traitements. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la première étude et suggèrent que cette mutation n'a aucun impact sur l'efficacité de ces traitements antiviraux *in vitro*. L'effet antiviral de ces molécules a également été étudié sur deux autres modèles cellulaires : des cellules de rein d'embryon équin (EEK) et des cellules de rein de lapin (RK13). La gemcitabine n'a présenté aucun effet antiviral sur ces deux modèles cellulaires et a été retirée de la liste des candidats potentiels. L'ACV a, quant à lui, présenté des valeurs d'EC₅₀ plus élevées par comparaison aux autres candidats.

Sur la base de ces résultats, une étude de combinaison a été réalisée entre le VGCV, et les molécules suivantes : aphidicolin, DTB, idoxuridine et pritelivir. L'utilisation de molécules présentant un effet synergique pourrait permettre de diminuer la dose de traitement de chacun des composés à administrer, et ainsi réduire le coût du traitement et de potentiels effets toxiques. L'ensemble des différentes combinaisons a d'abord été évalué par impédancemétrie avec la méthode MacSynergy II. Seule la combinaison VGCV/DTB a montré un effet synergique (63,24 $\mu\text{M}^2\%$) alors que les autres combinaisons ont toutes montré un effet additif. L'effet synergique

entre le VGCV et la DTB a été confirmé par impédancemétrie en utilisant l'analyse par isobogramme et par qPCR avec la méthode de Chou-Talalay.

Si le VGCV a bien été développé comme traitement antiviral contre des herpèsvirus humains, ce n'est pas le cas de la DTB. En effet, il s'agit d'une molécule anticancéreuse utilisée contre la leucémie myéloïde aiguë qui induit une hypométhylation de l'ADN cellulaire après son intégration (Liu et al., 2017). A notre connaissance, cette étude est la première à décrire un effet antiviral de la DTB contre un virus à ADN. L'effet antiviral de cette molécule a préalablement été décrit contre le VIH et le virus leucémogène félin (Clouser et al., 2010 ; Greggs et al., 2012). Tout comme la gemcitabine et la cytarabine (deux autres molécules identifiées parmi les 21 hits sélectionnés), la DTB est un analogue de la désoxyuridine. Des expériences réalisées à l'aide du RG108, inhibiteur de l'ADN méthyltransférase nous ont permis de démontrer que l'effet antiviral de la DTB n'était pas médié par une hypométhylation de l'ADN viral ou cellulaire dans notre modèle. En revanche, nous avons montré une compétition entre la désoxycytidine et la DTB. Ce résultat suggère que la DTB doit être phosphorylée par au moins la désoxycytidine kinase pour s'intégrer dans l'ADN viral et/ou bloquer la polymérase virale, entraînant ainsi l'inhibition de la réplication virale.

Cette étude a permis d'identifier 6 composés présentant une bonne efficacité contre l'HVE-1. Ces composés présentent tous, *in vitro*, une efficacité supérieure à celle de l'ACV, qui est la seule molécule étudiée chez le cheval dans le traitement d'infection à HVE-1 (Garre et al., 2009 ; Maxwell et al., 2017). L'effet synergique démontré entre le VGCV et la DTB constitue une piste d'avenir dans la lutte contre l'HVE-1, en particulier du fait de l'association de deux voies d'action différentes.

3. L'administration orale de valganciclovir réduit les signes cliniques, l'excrétion virale et la virémie chez des poneys infectés expérimentalement par la nouvelle souche C₂₂₅₄ d'herpèsvirus équin 1.

Article 4 "Letter"

R. Paillot, G. Sutton, C. Thieulent, C. Marcillaud-Pitel & S. Pronost

Veterinary Record 2020; 186 (17): 573

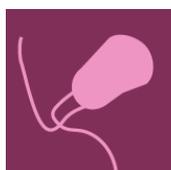
**Veterinary
Record**

PMID : 32451347

DOI : [10.1136/vr.m1441](https://doi.org/10.1136/vr.m1441)

Article 5

C. Thieulent, G. Sutton, Toquet M.-P., Fremaux S., Hue E., Fortier C., Pléau A., Deslis A.,
Guitton E., S. Pronost, R. Paillot



Pathogens ; en redaction

3.1. Introduction

L'utilisation de traitements antiviraux est en plein essor dans le monde comme le montre l'épidémie de SARS-CoV-2. Concernant la santé équine, aucune molécule antivirale ne possède d'autorisation de mise sur le marché en Europe et leur utilisation demeure sous la responsabilité des vétérinaires. L'aciclovir est la seule molécule ayant fait l'objet d'études expérimentales à ce

jour. Cependant, les résultats obtenus sont divergents et ne permettent pas de conclure sur une réelle efficacité de ce composé (Garré et al., 2009 ; Maxwell et al., 2017). Dans les articles précédents, nous avons démontré que le ganciclovir (GCV) et sa pro-drogue, le valganciclovir (VGCV) faisaient partie des molécules les plus efficaces contre l'HVE-1 *in vitro* et ceci, contre l'ensemble des souches d'HVE-1 étudiées. Bien que des données de pharmacocinétiques soient disponibles pour ces molécules dans l'espèce équine (Carmichael et al., 2013), leur efficacité n'a néanmoins jamais été étudiée *in vivo*.

En 2018, une recrudescence des foyers d'HVE-1 et d'HVE-4 a été enregistrée en France par le Réseau d'Epidémiologie et de Surveillance en Pathologies Equines (RESPE). Durant cette épidémie, un nouveau variant d'HVE-1, nommé FR-56628, présentant une nouvelle mutation en position 2254 du gène de l'ADN polymérase a été identifié au sein d'un des foyers infectieux. L'identification de cette nouvelle mutation (C₂₂₅₄) questionne sur les travaux précédents montrant l'association génotype/pathotype (Nugent et al. 2006, Goodman et al. ; 2007) et a fait l'objet d'une « letter » dans Veterinary Record (Article 4). Le travail de caractérisation de cette souche a été poursuivi d'un point de vue cellulaire et moléculaire dans le cadre de la thèse de Gabrielle Sutton (Sutton et al., 2020 : Annexe 4) et d'un point de vue pathologique dans le cadre de ce travail de thèse. En effet nous avons choisi de réaliser l'infection dans le cadre du challenge expérimental destiné à mesurer l'effet d'un traitement au valganciclovir (VGCV) avec cette nouvelle souche qui avait conduit à des formes respiratoire et nerveuse de la maladie.

Les résultats de ce travail sont présentés sous forme d'un article que nous allons soumettre à Pathogens. La version présentée dans ce manuscrit est une première version qui sera amendée pour soumission avant la soutenance de thèse. S'agissant d'un journal MDPI, nous avons pu mettre notre travail au format du journal, mais il s'agit bien d'une version avant soumission.

Lors de l'étude expérimentale, l'infection de 8 poneys Welsh mâles âgés de 10 mois a été réalisée par voie intranasale avec la nouvelle souche FR-56628 (C₂₂₅₄). Quatre 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 une concentration de 100 mg/mL dans du jus de pomme puis mélangé dans de la compote de pomme. Des expériences *in vitro* avaient été préalablement réalisées sur l'appareil RTCA xCELLigence® pour démontrer que ce procédé

n'affectait pas l'effet du VGCV. 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. Il s'agit d'un traitement par voie orale en utilisant un pistolet drogueur. Les 4 poneys contrôles ont reçu un placebo constitué d'un mélange de jus de pomme et de compote. Les signes cliniques, l'excrétion virale et la virémie ont été suivis pendant 3 semaines après infection. Cette étude a deux objectifs. Tout d'abord, évaluer l'effet d'un traitement par administration orale de VGCV chez des poneys infectés par l'HVE-1. Par la suite, l'analyse par culture cellulaire et qPCR de l'ensemble des prélèvements réalisés permettra de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie associée à la souche FR-56628 récemment isolée en France. Cette étude expérimentale a été réalisée au sein de la PlateForme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE, UE 1277) de l'INRAE de Nouzilly.

3.2. Article 4

LETTERS & NOTICES

EQUINE DISEASE

New EHV-1 variant identified

EQUINE herpesvirus type 1 (EHV-1) is an important threat to the equine industry worldwide. EHV-1 infection can induce respiratory disease, abortion in mares, neonatal death of foals and myeloencephalopathy (EHM). The reasons for the development of different forms of the disease remain largely unknown, but are likely to involve factors such as virus pathogenicity, environmental conditions, host immunity and genetic background.

A potential explanation was reported which identified that different ORF30 (DNA polymerase subunit) genotypes were significantly associated with different forms of disease.¹ Subsequently, EHV-1 strains were often generally categorised as neuropathogenic (G2254/D752) or non-neuropathogenic (A2254/N752).¹ While the association between the ORF30 A2254 genotype and abortion is now well described,¹⁻⁴ the association between a specific ORF30 genotype and EHM is less evident. ORF30 A2254G genotyping is still used

on a regular basis globally for strain discrimination and epidemiological surveys.²

In 2018, a surge of EHV-1/4 outbreaks was recorded in France by RESPE, the French epidemiological surveillance network in equine pathology. ORF30 A2254G genotyping allowed us to quickly rule out the emergence of one specific EHV-1 strain as the explanation for this situation (ie, both A2254 and G2254 variants were frequently identified).⁴ It was more likely the result of a noticeable decrease in EHV vaccine uptake in the preceding months.

However, investigation of one specific outbreak that lasted several weeks in 2018, led to the fortuitous identification of a new ORF30 variant in gene position 2254. While all EHV strains from this outbreak were detected by a conventional gB qPCR method, the conventional ORF30 2254 genotyping repeatedly failed to provide any results. ORF30 sequencing subsequently revealed that all strains carried a C2254 mutation (H752). All affected horses were vaccinated, with booster immunisations every six months. At least 58 horses (approximately 25 per cent of the total) showed clinical signs of respiratory disease, with hyperthermia and hindlimb oedema. Two horses also developed neurological signs of disease, including one that died.

To our knowledge, this mutation has never been described before. The extent of the genetic variation and the significance of this mutation on DNA polymerase activity, virus replication and pathogenicity is now under investigation. Preliminary results indicate that experimental infection with the C2254 EHV-1 strain under controlled conditions induces a rapid onset of marked respiratory disease lasting at least two weeks in Welsh mountain ponies, with significant virus shedding and cell-associated viraemia.

Despite whole genome sequencing and multilocus sequence typing,⁴⁻⁶ it is encouraging that the single nucleotide polymorphism (SNP) approach still proved useful. However, the sole use of the current ORF30 2254 genotype assay by some diagnostic laboratories should be an immediate concern



Investigation of one specific outbreak ... led to the fortuitous identification of a new ORF30 variant

as this new ORF30 2254 variant will induce false negative results. This event also highlights the importance of multiple diagnostic methods for EHV surveillance in the field.

Romain Paillot, head of equine health
Gabrielle Sutton, Côme Thieulent, PhD students

Christel Marcillaud-Pitel, head of RESPE
Stéphane Pronost, deputy head of research
LABÉO Frank Duncombe/UnICAEN Biotargen/
RESPE, 14280, Saint-Contest, France
email: romain.paillot@laboratoire-labeo.fr

References

- 1 Nugent J, Birch-Machin I, Smith K, *et al.* Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J Virology* 2006;80:4047-60
- 2 Lunn D, Davis-Poynter N, Flaminio M, *et al.* Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J Vet Intern Med* 2009;23:450-61
- 3 Pronost S, Cook R, Fortier G, *et al.* Relationship between equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy and viral genotype. *Equine Vet J* 2010;42:672-74
- 4 Sutton G, Garvey M, Cullinane A, *et al.* Molecular surveillance of EHV-1 strains circulating in France during and after the major 2009 outbreak in Normandy involving respiratory infection, neurological disorder, and abortion. *Viruses* 2019;11:916
- 5 Bryant N, Wilkie G, Russell C, *et al.* Genetic diversity of equine herpesvirus 1 isolated from neurological, abortigenic and respiratory disease outbreaks. *Transbound Emerg Dis* 2018;65:817-32
- 6 Garvey M, Lyons R, Hector R, *et al.* Molecular characterisation of equine herpesvirus 1 isolates from cases of abortion, respiratory and neurological disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens* 2019; doi: 10.3390/pathogens8010007

doi: 10.1136/vr.m1441

3.3. Article 5 : en rédaction



Article

Oral administration of valganciclovir reduces clinical signs, virus shedding and cell-associated viremia in ponies experimentally infected with the new variant C₂₂₅₄ of equid herpesvirus-1

Côme Thieulent^{1,2}, Gabrielle Sutton^{1,2}, Marie Pierre Toquet^{1,2}, Samuel Fremaux¹, Erika Hue^{1,2}, Christine Fortier^{1,2}, Alexis Pléau⁴, Alain Deslis⁴, Edouard Guitton⁴, Stéphane Pronost^{1,2}, and Romain Paillot^{1,2,3*}

¹ LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France; come.thieulent@laboratoire-labeo.fr; gabrielle.sutton@laboratoire-labeo.fr; marie-pierre.toquet@laboratoire-labeo.fr; stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr; erika.hue@laboratoire-labeo.fr; christine.fortier@laboratoire-labeo.fr

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

³ School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle, Chelmsford CM1 3RR, United Kingdom. romain.paillot@writtle.ac.uk

⁴ INRAE, UE-1277 Plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE), Centre de Recherche Val de Loire, 37380 Nouzilly, France. alexis.pleau@inrae.fr, alain.deslis@inrae.fr, alexis.pleau@inrae.fr, edouard.guitton@inrae.fr

* Correspondence: romain.paillot@writtle.ac.uk

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Equid alphaherpesvirus-1 (EHV-1) is one of the main pathogens in horses responsible for respiratory diseases, eye diseases, abortions, death of neonatal foals and neurological signs such as equine herpesvirus myeloencephalopathy (EHM). Current vaccines reduce the excretion and dissemination of the virus and therefore the extent of an epizooty, but there is no evidence of efficacy against the neurological form. No antiviral treatment against EHV-1 is marketed and recommended to date. This study examines the effect of treatment with valganciclovir (VGCV), the oral prodrug of ganciclovir, on Welsh mountain ponies experimentally infected with EHV-1 C₂₂₅₄ strain. Four of eight ponies were treated with VGCV, while the other four received placebo. The treatment consists in 6.5 mg/kg body weight of valganciclovir three times the first day and twice daily during 13 days. The severity of the cumulative clinical score was significantly reduced in the treated group compared to the control group. The excretion of the infectious virus was significantly reduced in the treated group compared to the control group between D+1 and D+12. Viremia was significantly reduced in the treated group when compared with the control group. A seroconversion was observed from D+10 and D+11 for the ponies of the control groups and treated, respectively. Oral administration of valganciclovir reduces clinical signs, virus shedding and cell-associated viremia in ponies infected with the new variant C₂₂₅₄ of EHV-1.

Keywords: Valganciclovir, EHV-1, Equid alphaherpesvirus-1, antiviral, experimental infection, pony

1. Introduction

Equid alphaherpesvirus-1 (EHV-1) is one of the main pathogens of horses, with an estimated prevalence of 60%. It is responsible for respiratory diseases, ocular disease abortions, neonatal foal deaths and neurological signs of disease such as equine herpesvirus myeloencephalopathy (EHM)

[1,2]. The primary infection of EHV-1 take place in the upper respiratory tract. Then, EHV-1 crosses the basement membrane using lymphocytes as “Trojan horse” to reach the blood circulation [3,4]. The cell-associated viremia induces a dissemination of the virus to secondary sites of infection, such as the central nervous system (CNS) and the uterus of pregnant mare. A decade ago, studies suggest that EHM is associated with a single nucleotide polymorphism at position 2254 in the EHV-1 DNA polymerase gene (ORF 30) [5,6]. Since these findings, EHV-1 strain G₂₂₅₄ are considered to have neuropathogenic potential. Whereas, EHV-1 strain A₂₂₅₄, are thought to be non neuropathogenic and usually associated with abortion and respiratory disease in horses [7]. However, beside this discovery, the impact of this mutation is currently debated [7–11]. Recently, a new variant of EHV-1 (C₂₂₅₄), resulting in a histine (H₇₅₂), was isolated in vaccinated horses with respiratory and neurological diseases in France [12,13].

Vaccination is used from several decade as preventive strategy against EHV-1. Current vaccines reduce virus shedding and dissemination and therefore the extent of an outbreak. However, only one commercially available EHV vaccine has a claim against abortion and no claim to be effective against the EHM [14]. There is no EHV-1 antiviral treatment commercialised and recommended until now. A recent study identified 21 compounds effective *in vitro* against EHV-1 in a screening of almost 3000 compounds [15]. Among them, valaciclovir (VACV), the pro-drug of aciclovir (ACV), is the only one tested against EHV-1 in experimental infections [16,17]. Oral administration of 40 mg/kg of VACV, the oral prodrug of ACV, 3 times daily, for one week on EHV-1 infected ponies do not show any beneficial effect [16]. However, the oral administration of 27 mg/kg of VACV, 3 times daily, for 2 days, followed by oral administration of 18 mg/kg of VACV, 2 times daily, for 5 and 12 consecutive days on experimentally EHV-1 infected horses showed beneficial effects [17]. This treatment significantly reduced the virus shedding and the cell-associated viremia. Although the treatment did not significantly reduce each clinical sign taken separately, it significantly reduced the cumulative clinical score. In both studies, the plasma concentration of ACV determined for the duration of treatment was maintained above the half maximal effective concentration (EC₅₀) determined *in vitro*. Conflicting results obtained in these both studies do not allow to conclude on a real effectiveness of the VACV treatment against EHV-1 *in vivo*. ACV was also administrated on horses during several natural outbreaks of EHV-1. However, conflicting results has been reported and it is difficult to interpreted these results, notably due to a lack of controls [18–21].

Ganciclovir (GCV), is actually the most effective compound identified against EHV-1 *in vitro* [15] and is 10-fold more effective than ACV [22,23]. However, evidences supporting the efficacy of GCV *in vivo*, or its prodrug VGCV, are still lacking. GCV is a nucleoside analogue of 2'-deoxyguanosine, extensively used for the treatment of cytomegalovirus (CMV) infections [24,25]. Other human herpesviruses are sensitive to GCV *in vitro*, including herpes simplex virus 1 and 2, Varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, human herpesviruses 6, 7 and 8 [26]. Oral bioavailability of GCV is poor in humans, averaging approximately 7 % [27] and is slightly improved when administrated with meal. Facing those poor results, valganciclovir (VGCV), the L-valyl ester prodrug of GCV is used instead [28,29]. In fact, the bioavailability of GCV from oral VGCV administration is estimated at 60 % [30]. After oral administration, VGCV is well absorbed by the gastrointestinal tract and rapidly hydrolysed into GCV in the intestinal wall and liver. In horse population, pharmacokinetics of GCV (intravenous route) and VGCV (oral route) were previously measured [31]. Oral administration of 1800 mg of VGCV dissolved in lemon juice and mixed with syrup and flour showed a bioavailability of GCV ranging from 21 % to 61 %. Although the oral absorption of VGCV is variable between horses, VGCV appears to be a good candidate for a treatment against EHV-1.

The aim of this study was to determine the therapeutic efficacy of VGCV against EHV-1 on experimentally EHV-1 infected ponies. Clinical signs of disease, viral shedding and cell-associated viremia were measured. In addition, the pathogenicity of the new EHV-1 variant (C₂₂₅₄) was evaluated.

2. Results

2.1. Valganciclovir administration and pharmacokinetics

We first controlled by an *in vitro* experiment that apple juice did not affect VGCV activity. Impedance measurement of E. Derm cells infected with EHV-1 KyD strain and treated with 0.1 or 10 µg/mL of VGCV dissolved in apple juice (100 mg/mL) over-night at 4°C or in PBS (just before treatment) was presented in figure 1. VGCV showed antiviral activity at 10 µg/mL and not at 0.1 µg/mL. The mode of preparation (i.e. apple juice or PBS) had little effect on the antiviral activity but did not alter VGCV activity.

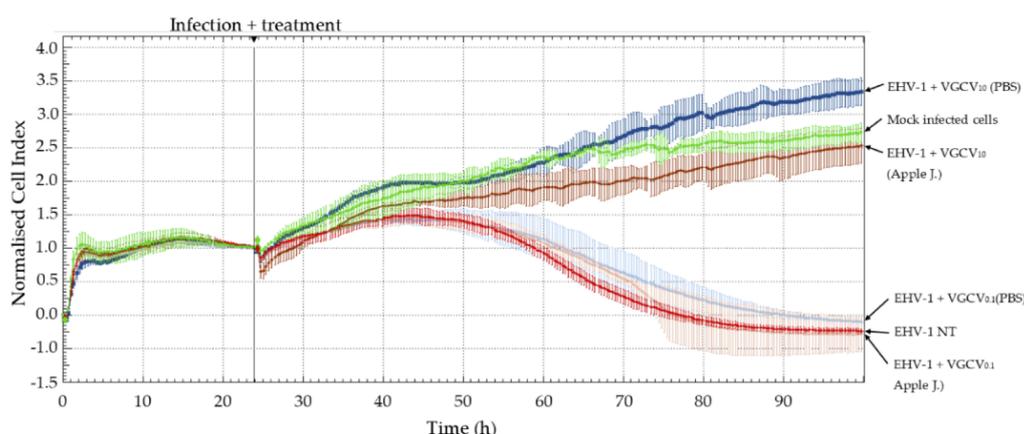
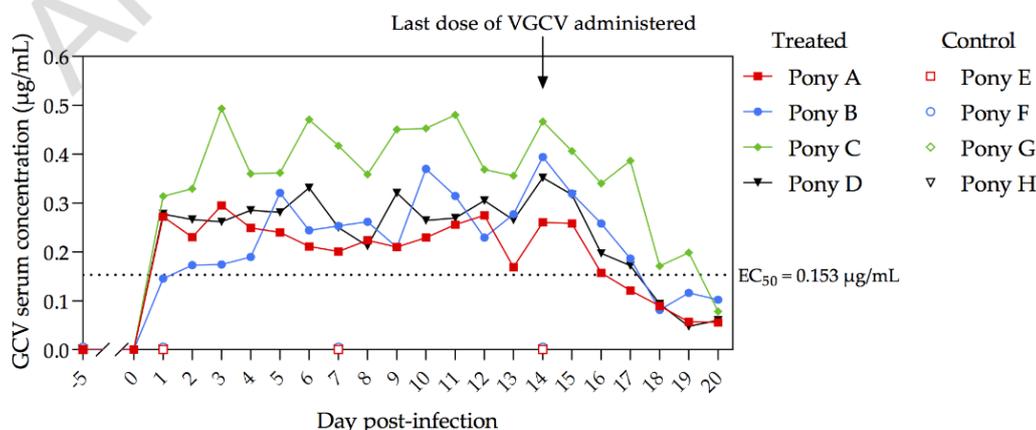


Figure 1. Real time monitoring of E. Derm cells infected with EHV-1 KyD strain and treated with valganciclovir (VGCV) dissolved in PBS or apple juice. The Cell Index was normalized (CI_n) at the last time point before infection (black vertical line). The red curve represents the CI_n of EHV-1 infected cells and untreated cells. The green curve represents the CI_n of EHV-1 infected cells and treated with VGCV at 10 µg/mL (VGCV₁₀) and 0.1 µg/mL (VGCV_{0.1}) dissolved in PBS just before use (PBS) or over-night at 4°C in apple juice (Appel J.), respectively. Each data point indicates the mean ± standard deviation of one assay in duplicate. Three independent experiments were performed.

The concentration of GCV was measured in the serum from the 4 treated ponies each day during 20 days and in the control group for day 1, 7 and 14 (figure 2). Serum concentration was maintained above the EC_{50} value of 0.153 µg/mL in all treated ponies for the duration of treatment (D+1 to D+14).



The mean serum concentration was 0.295 ± 0.068 $\mu\text{g/mL}$. No GCV was detected prior to treatment (D0) in serum of treated ponies and in the serum of all controls ponies during the study.

Figure 2. Serum concentration of ganciclovir over time from D-5 to D+20 for ponies treated for 14 days. Bloods samples were taken just prior to the first daily valganciclovir administration (6.5 mg/kg body weight). Half maximal effective concentration (EC_{50}) of ganciclovir was previously determined *in vitro* against the EHV-1 FR-56628 strain on equine embryonic kidney cells (Thieulent et al., 2020). No GCV was detected in serum samples from controls ponies at D-5, D+1, D+7 and D+14.

2.2. Clinical signs of disease

All ponies developed clinical signs of disease after experimental infection with EHV-1 (fever, nasal discharge, cough, mandibular lymphadenopathy, ocular discharge and change of attitude). The number of observation and the severity of the clinical signs of disease are presented in Table 1.

Table 1. Means \pm standard deviation (S.D.) of the number of clinical observation (observations were performed twice a day) and severity of signs of disease for the control and treated groups (4 ponies by group) from D-3 before infection to day 21 post infection, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Clinical signs	Type of analysis	Control group (Mean \pm S.D.)	Treated group (Mean \pm S.D.)	P-value
Pyrexia (> 38.8 °C)	Observation (n)	15.0 \pm 3.6	6.8 \pm 2.6	0.029 (*)
	Severity	1.9 \pm 0.5	1.0 \pm 0.2	0.21
Nasal discharge	Observation (n)	39.3 \pm 1.5	36.0 \pm 1.8	0.033 (*)
	Severity	2.5 \pm 0.4	1.9 \pm 0.1	0.028 (*)
Cough	Observation (n)	9.5 \pm 5.9	5.5 \pm 4.7	0.56
	Severity	1.3 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	0.0012 (**)
Mandibular lymph node size	Observation (n)	23.8 \pm 4.0	22.3 \pm 11.6	0.56
	Severity	1.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.3	0.33
Ocular discharge	Observation (n)	9.8 \pm 9.0	6.5 \pm 5.5	0.96
	Severity	1.2 \pm 0.3	1.2 \pm 0.8	0.56
Behaviour	Observation (n)	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	N.D.
	Severity	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	N.D.
Cumulative clinical score	Observation (n)	40.5 \pm 0.6	39.3 \pm 1.0	0.088
	Severity	4.5 \pm 0.4	3.3 \pm 0.5	0.0086 (**)

The peak of pyrexia was reached at D+2 for control and treated groups (Figure 3a). Pyrexia was recorded in the control group during 15 observations from D+1.5 to D+8.5, whereas ponies of the treated group were pyretic during 6.8 observations from D+1.5 to D+6.5. The average number of observation was significantly reduced in the treated group when compared with the control group ($p = 0.029$). However, the severity (based on the actual body temperature measured) was similar between the two groups.

Nasal discharges were observed at D+1 and recorded throughout the study. The duration and the severity of nasal discharges were significantly reduced in the treated group when compared with the control group ($p = 0.033$ and $p = 0.028$, respectively). All control ponies showed mucopurulent discharges from D+4 to D+12 while it was only observed in 3 treated ponies at D+5 (ponies A and D) and D+7 (pony B).

Cough was recorded for one control pony at D+1 (pony E) and in all control ponies on D+2. Only 2 treated ponies coughed at D+2 (ponies A and C). Cough was then recorded intermittently from D+3 to D+21 from all ponies. The cough severity was significantly reduced in treated group ($p = 0.0012$). However, the number of observation of cough was similar between the two groups.

Mandibular lymph node enlargement was observed for one control pony on D+2 (pony G), and in all control ponies from D+3 to D+11. Mandibular lymph node enlargement was observed on D+3 for two treated ponies (A and D) and on D+4 for two others (B and C). Mandibular lymph node returned to their normal size at D+6.5 for pony B and at D+14 for the three other treated ponies.

All ponies from the control group and 3 ponies from the treated groups (A, B and C) showed ocular discharges with a peak at D+3 and D+4.

All ponies showed signs of lethargy on D+2 and had a tail hypotonia from D+2 to D+4/5. Reduction of food consumption was also observed during the first week post-infection. No pony showed sign of neurological disease during this study.

The daily cumulative clinical score is shown in Figure 3b. It increases rapidly after infection with a peak at D+2 (8.8 ± 1.6) for the control group and a peak at D+4.5 (6.3 ± 1.0) for the treated group. The daily cumulative clinical score decreased at D+7 and D+10 for the treated and control groups, respectively. The cumulative clinical score severity was significantly reduced in the treated group when compared with the control group ($p = 0.0088$).

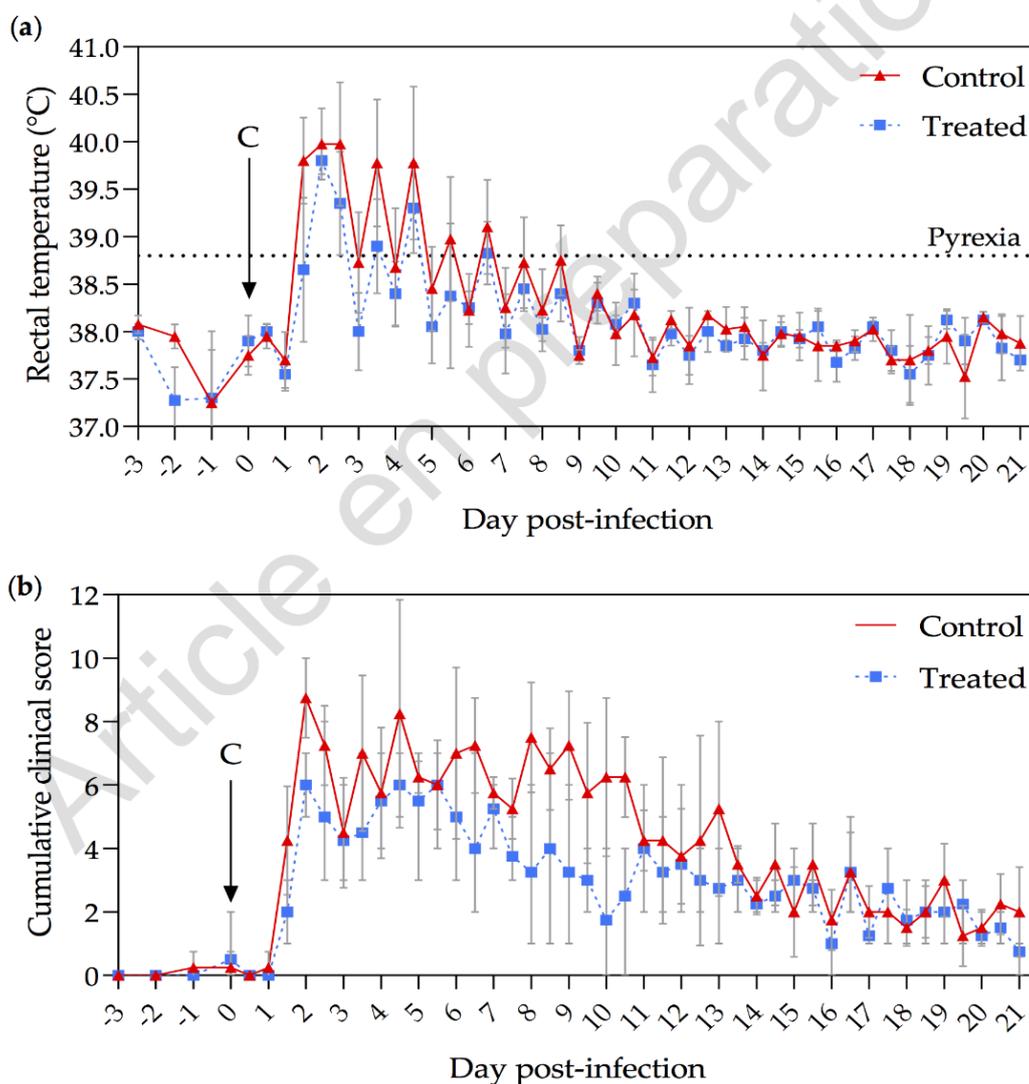


Figure 3. Clinical signs of disease recorded from the control (red circles and solid line) and treated (blue squares and dotted line) groups. (a) Daily rectal temperature (°C) of ponies before and after

infection with EHV-1 FR-56628 strain (D0). Temperatures > 38.8 °C were considered pyretic. (b) Cumulative clinical score before and after infection. Cumulative clinical score was calculated using the score for each clinical sign according to the formula described in Materials and Methods. Clinical evaluations were performed daily from day 3 before EHV-1 infection (D-3) to the day of infection (D0) and twice daily from day 1 post-infection (D+1) to D+21. All graphs show means and standard deviation per group. "C" means the date of the challenge.

2.3. Nasopharyngeal shedding

EHV-1 was detected by qPCR assay in nasopharyngeal secretions from all ponies from D+1 to D+16 (Figure 4a). At D+18, EHV-1 was detected in 3 ponies for each group (ponies A, B, C, F, G and H). At D+20 (last sample collected) shedding amount of EHV-1 were still detectable in only two ponies per group (ponies B, C, F and G). The highest EHV-1 concentration was measured at D+4 for both groups with a plateau phase between D+2 and D+12. From D+14, the amount of EHV-1 decreased. Amount of virus shedding was not significantly different between treated and control groups from D+1 to D+20 ($p = 0.8$) when measured by qPCR assay.

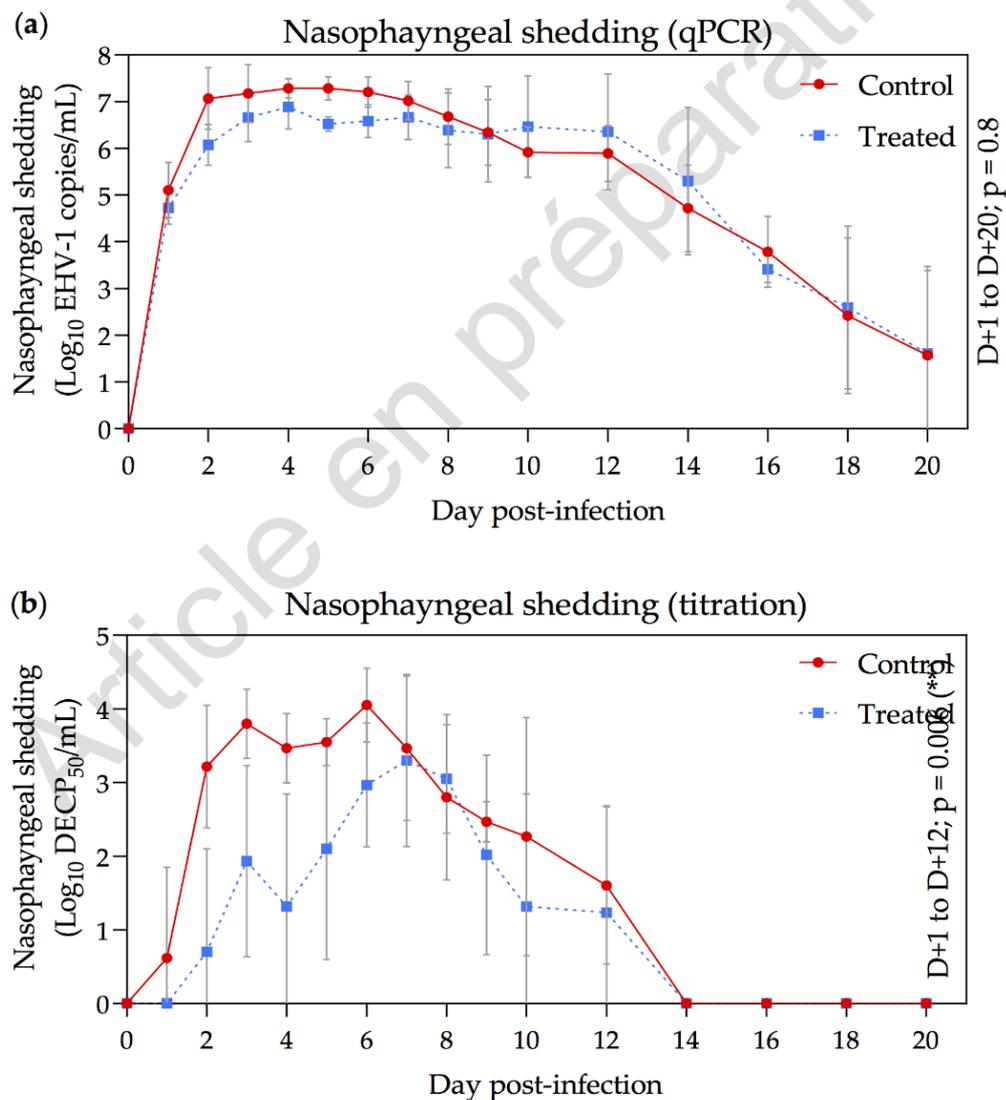


Figure 4. Mean \pm standard deviation of EHV-1 nasopharyngeal shedding in the control group (red circles and solid line) and the treated group (blue squares and dotted line). All ponies were inoculated with EHV-1 FR-56628 strain on day 0 (D0). Nasopharyngeal shedding was measured by qPCR assay (a) and infectious virus titres were measured on RK13 cells monolayer (b).

Titration of infectious viruses from nasopharyngeal secretions is shown in Figure 4b. EHV-1 was isolated from one control pony at D+1 (pony H) and in all four control ponies at D+2. EHV-1 was isolated from one treated pony at D+2 (pony A), three treated ponies at D+3 (ponies A, C and D) and in all treated ponies at D+6. The highest titre was measured at D+6 for the control group (4.05 ± 0.50 TCID₅₀/mL) and at D+7 for the treated group (3.30 ± 1.17 TCID₅₀/mL). Infectious virus titres began to decrease at D+6 or D+7 (control and treated groups, respectively). From D+14, no infectious EHV-1 was detected. Infectious virus shedding was significantly reduced in the treated group when compared with the control group between D+1 to D+12 ($p = 0.0058$).

2.4. Viremia

EHV-1 was detected in all ponies when viral DNA extraction was performed on 2 mL of whole blood (Figure 5a). Viremia was detected in one control pony at D+3 (pony E) and in all control ponies from D+5 to D+20 with a peak at D+9 (5.23 ± 0.24 Log₁₀ EHV-1 copies/mL). Viremia was detected in all treated ponies from D+5 to D+15 and intermittently from D+16 to D+20. Viremia was significantly reduced in the treated group when compared with the control group between D+5 to D+20 ($p = 0.015$).

When DNA extraction was performed on 2.10^6 PBMCs, cell-associated viremia was detected in one control pony at D+4 (pony H), in all control ponies from D+6 to D+11, in three control ponies at D+12 (ponies F, G and H) and in only one control pony at D+13 (pony G) (Figure 5b). Cell-associated viremia was detected on two treated ponies at D+6 (ponies A and C), on three treated ponies from D+7 to D+12 (ponies A, B and D), but only one pony showed cell-associated viremia at D+10 (pony D). Peak of cell-associated viremia was reached at D+9 (4.14 ± 0.42 Log₁₀ EHV-1 copies/ 2.10^6 PBMCs) and at D+8 (2.73 ± 1.91 Log₁₀ copies/ 2.10^6 PBMCs) in the control and treated groups, respectively. Cell-associated viremia was significantly reduced in the treated group when compared with the control group between D+4 to D+13 ($p = 0.03$).

Cell-associated viremia was also measured by co-culture of 1.10^6 PBMCs on RK13 cells monolayer for 72h. Results of cytopathic effects (CPE) formation and viral load quantitation by qPCR assay are presented in Figure 5c and Figure 5d, respectively. CPEs were counted by microscopic observation after 72h of co-culture. CPEs were observed from D+4 to D+11 for the control group and from D+5 to D+12 for the treated group. The number of ponies with positives results, when measured by co-culture on a permissive cell line, was significantly reduced in the treated group when compared with the control group ($p = 0.011$). However, there was no statistical difference in the number of CPE counted in each well between control and treated groups (data not shown). When viral load was measured by qPCR assay on cell culture supernatant of 1.10^6 PBMCs co-cultured 72h on RK13, EHV-1 was detected from D+4 to D+17 in both groups. No significant difference was observed between the treated and control groups from D+3 to D+17 ($p = 0.17$) (Figure 5d).

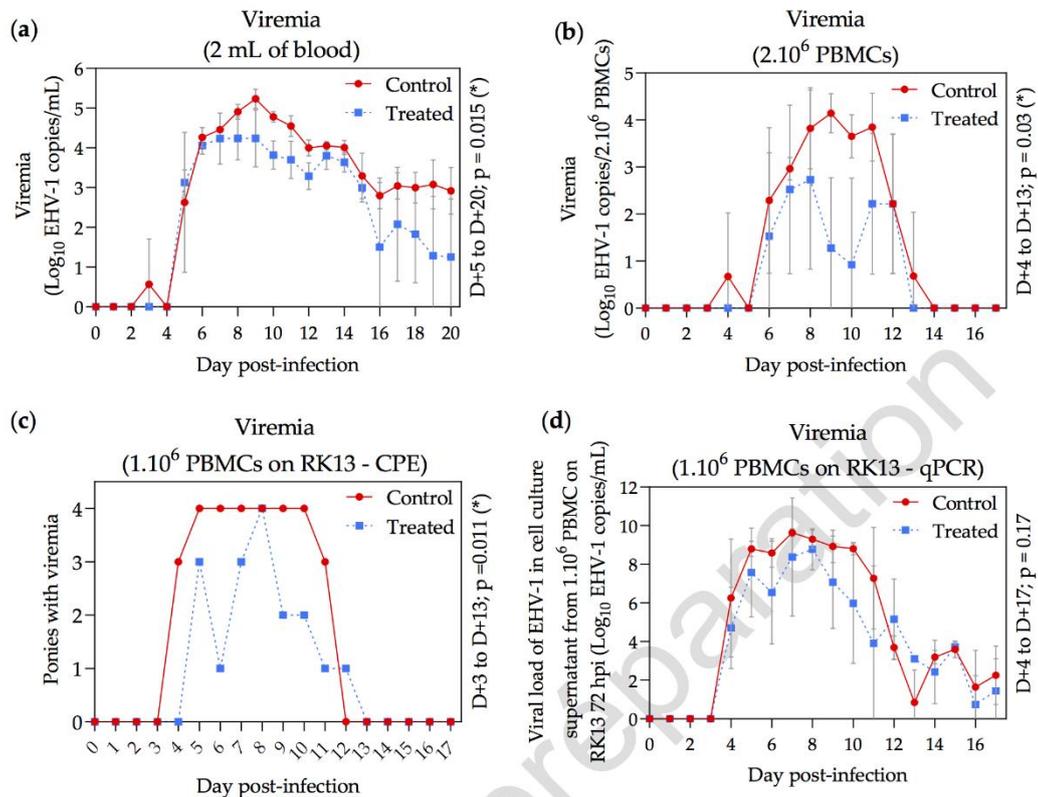


Figure 5. Kinetics of blood and cell-associated viremia. All ponies were experimentally infected with EHV-1 FR-56628 strain at day 0 (D0). The presence of EHV-1 was measured by qPCR assay in 2 mL of blood (a) or in $2 \cdot 10^6$ PBMCs (b). Number of ponies with cell-associated viremia when $1 \cdot 10^6$ PBMCs were co-cultured 72 h on RK13 cells monolayer and observed by microscopy (c). The presence of EHV-1 was measured by qPCR assay in the supernatant collected from these co-culture (i.e. $1 \cdot 10^6$ PBMCs co-cultured 72 hours on RK13 cells monolayer) (d). Results from the control group are presented in red (circles and solid line) or in blue for the treated group (squares and dotted line).

2.5. Pathogens identification

The C₂₂₅₄ mutation was confirmed in nasopharyngeal and blood samples collected at D+5, D+10, D+16 and D+20 from all ponies. The mutation A₂₂₅₄ and G₂₂₅₄ were not detected (data not showed). In addition, no EHV-4 was detected in nasopharyngeal secretions and in the blood samples of all ponies when tested by qPCR assay at D+5, D+10, D+16 and D+20.

2.6. Serological response

The virus neutralization antibody titre was evaluated at D-5 and from D+0 to D+20 in the serum of all the ponies (Figure 6). Seroconversion was observed from D+10 and D+11 for ponies of control and treated groups, respectively. No significant difference was observed between the treated and controls groups ($p = 0.35$).

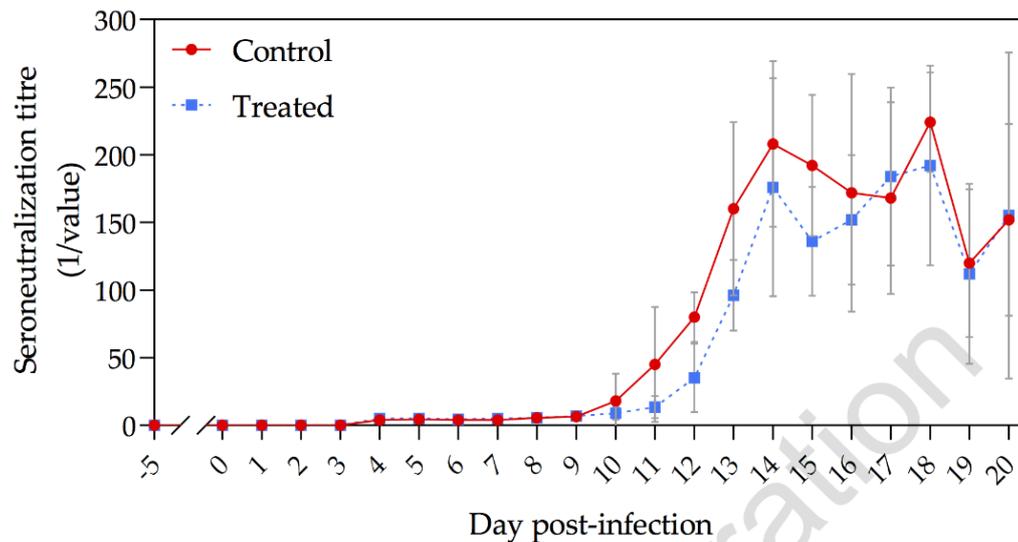


Figure 6. Mean \pm standard deviation of virus neutralization antibody titre in serum samples collected from each pony in the control group (red circles and solid line) and in the treated group (blue squares and dotted line) before and after experimental infection with EHV-1 FR-56628 strain at D0.

3. Discussion

This study investigates the effect of valganciclovir (VGCV) treatment, the oral prodrug of ganciclovir, on Welsh mountain ponies experimentally infected with EHV-1. Four ponies were administered VGCV (6.5 mg/kg body weight, 3 doses on D0 and 2 doses per day subsequently, for 13 days). The four other ponies were used as controls and received a placebo. Ponies were monitored for 4 weeks before challenge. No clinical sign of infection was recorded, no virus was detected in nasopharyngeal secretion and none of them had detectable EHV-1 neutralizing antibodies during this pre-inoculation period. In addition, seroconversion observed between D+10 and D+14 for all young ponies indicate a primary response to EHV-1 infection.

No adverse effect of VGCV orally administered was observed throughout this study in any ponies. This result concurs with a previous study where a single orally dose of VGCV was administered in horses [31]. In the current study, the serum GCV concentration was maintained for the duration of the treatment (i.e. 14 days) above the EC_{50} value (0.153 $\mu\text{g/mL}$), which was previously determined *in vitro* on equine embryonic kidney cell [15]. These results demonstrate that the molecule is indeed present in its active form in the organism of the animal throughout the challenge.

Ponies were experimentally infected with the EHV-1 FR-56628 strain [12] by individual nebulization, as previously described for equine influenza [32]. This strain was isolated from PBMCs of horse during an outbreak occurring in France in 2018 (Sutton et al., 2020). During this outbreak, two cases of EHM were recorded, leading to the euthanasia of one of them (Sutton et al., 2020). In this study, all infected ponies had developed respiratory signs two days post infection. Ocular discharges, submandibular lymph nodes enlarged and limp tail was also observed. However, neurological signs associated with EHV-1 infection were observed during this study. This could be explained by the age of the ponies (10 months) enrolled in this study. It has been previously reported that hold horses and mares were more susceptible to develop neurological signs. In addition, ponies are less susceptible to develop neurological signs [2]. Prevalence of EHM is not high and another

explanation could be that the number of ponies involved in the study is too low to observe this form of the disease

The administration of VGCV to ponies leads to a decrease in respiratory signs induced by EHV-1. Duration of fever and nasal discharge was reduced and the severity of nasal discharge, cough and cumulative clinical score were also reduced. Previous studies have evaluated the effect of another anti-herpetic molecule, valaciclovir (VACV), the prodrug of acyclovir on ponies [16] and horses [17] during experimental infection. However, the results obtained in these studies are divergent. In EHV-1 experimentally infected ponies, no beneficial effects were observed after VACV treatment. In contrast, in the second study [17] pyrexia, total clinical signs, nasopharyngeal secretions and viraemia were reduced when VACV was administered one day before virus inoculation.

In this study, virus excretion was measured by two different methods (qPCR and virus titration in cell culture). EHV-1 was detected by qPCR from D+1 to D+16 in the nasopharyngeal secretions of all ponies, with a viral shedding time up to 20 days for some individuals.

However, EHV-1 could not be isolated in nasal secretion after D+12. Isolation of the virus has the advantage of showing the presence of infectious virus in nasopharyngeal secretions, but was less sensitive compared to the qPCR test. Infectious virus was detected in nasopharyngeal secretions from only 57% and 41% from control and treated ponies tested positive by qPCR assay, respectively.

As no EHV-1 was isolated from D+14 (Figure 4b), EHV-1 DNA detection at this time was probably residual non-infectious viral particles. In our study, antiviral treatment with VGCV slightly delays the peak of infectious virus excretion and significantly reduced the amount of infectious virus released in nasopharyngeal discharges. However, this observation cannot be made on qPCR assay results.

Mucopurulent discharges were observed in most of the control ponies from D+4 to D+11. While mucopurulent discharges were only observed in three control ponies for short periods of one day between D+4 to D+9. We can then assume that VGCV had a positive effect against the action of EHV-1. The protocol did not include bacteriological analysis, so we were unable to measure a potential effect on secondary bacterial infection.

Viremia was measured using different methods, viral DNA extraction from blood, viral extraction from 2.10^6 PBMCs and co-culture of 1.10^6 PBMCs on RK13 monolayer. Although all treated ponies exhibited viremia, this was significantly reduced compared to the control group. In our study, viraemia appears on D+3/D+4 post-infections, i.e. 2/3 days after the appearance of the first clinical signs. This result is consistent with previous studies[33,34].

Our results suggest that an absence of ECP does not mean that there is no infectious virus in the sample and underlines the importance of the positivity threshold of the techniques used[35,36]. The degree of viremia is known to be an important factor implicated in the development of secondary forms of the disease, such as abortion and EHM [2].

Due to the limitation of available vaccines, treatment with VGCV represents a potential strategy to limit the spread and development of secondary forms of disease during EHV-1 outbreaks. We have previously demonstrated that VGCV was effective at comparable concentrations *in vitro* against EHV-1 strains from the EHV-1 field which present the three mutations known at this time at position 2254 of the viral DNA polymerase (ORF30; A₂₂₅₄, C₂₂₅₄, G₂₂₅₄) [15]. We can hypothesize that the antiviral activity of VGCV observed *in vivo* within the framework of this study with strain C2254 is likely to apply to other strains of EHV-1.

We recently demonstrated that VGCV acts synergistically with decitabine, a deoxycytidine analogue in vitro against EHV-1 [14]. The synergistic effect observed in vitro and the cost of treatment could be improved in the future by identifying new antiviral cocktails. In addition, since seroconversion was noted 14 days after infection for all ponies, this means that it is not necessary to continue treatment for more than 2 weeks.

4. Materials and Methods

Animals and study design

Eight 10-month males welsh mountain ponies were included in this study. They were weighed at 41 (D-41) and 10 days (D-10), before experimental infection. They were between 124 kg and 162 kg with a median at 153 kg of body weight. Ponies were randomly assigned to the treated or control group of four subjects using <http://www.randomization.com> (seed 28092). All ponies were seronegative for anti-EHV-1/4 antibodies in serum as determined by sero-neutralisation and complement fixation tests at D-28 and D-5. EHV-1, EHV-4, EHV-2, EHV-5 and equine influenza virus were not detected in nasal secretions at D-5. All animals were housed together in an isolated and daily cleaned stable. They were fed daily with a commercial complete feed and drinking water was supplied *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council, in the facilities of the EU-1277 Plateforme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE, INRAE, 2018. Infectiology of farm, model and wild animals facility, [49]), Centre Val de Loire, Nouzilly, France. All experimental procedures were approved by the Loire Valley ethical review board (CEEA VdL, committee number 19, authorization number APAFiS#22708). Following the PFIE procedure, all study animals were euthanized using Dolethal (pentobarbital) injection. Post-mortem samples were collected for future histological study. All laboratory experiments were made under blind condition. Due to the management, blinding was not possible for clinical evaluation in this study. Diagram of the experimental design of this study is depicted in Supplementary Table 1. This report follows the CONSORT 2010 guidelines (Supplementary Figure 1) [37,38].

Virus and experimental infection

The French EHV-1 strain FR-56628 was used at the third passage on rabbit kidney (RK13) cells. This strain was isolated in 2018 from the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of one horse showing respiratory diseases. It possesses a C mutation at position 2254 in viral DNA polymerase gene [12]. After virus amplification, nucleic acids were extracted from culture supernatant and tested positive for EHV-1 using Diallo et al. (2006) PCR detection. Another typing PCR assay was performed to confirm the ORF30 C₂₂₅₄ mutation in position 752 as described previously [13]. Presence of EHV-1 strains with G₂₂₅₄ and A₂₂₅₄ mutations, EHV-4, EHV-2, EHV-5 and equine influenza virus was controlled. All were negative.

Individual nebulisation was performed using a foal Flexineb® nebuliseur (VLC Europe, Bazoches sur Guyonne, France) at day 0 (D0) as previously described for equine influenza virus experimental infection [32]. The inoculum containing 2 mL of virus suspension holding 5.10^7 tissue culture infectious dose₅₀ (TCID₅₀) was placed in the holding chamber of the nebuliser attached to a face mask. The duration of nebulisation was 2 minutes. The virus titration was realised on RK13 cells using Karber method [39].

Valganciclovir administration

Four of the eight ponies were treated with VGCV (treated group), while the other four received placebo (control group). The treatment consists in 6.5 mg/kg body weight of valganciclovir (Mylan S.A.S., Saint-Priest, France) three times the first day (D0) and twice daily during 13 days (D+1 to D+13). The first dose was given 2 hours prior inoculation. Treatments were prepared identically each day: VGCV was dissolved in apple juice at 100 mg/mL and stored over-night at 4°C. The appropriate volume of VGCV, depending of the weight of the animal, was mixed just before treatment in a drug gun containing 15 mL of apple compote (Figure 7). Placebo treatment contains 10 mL of apple juice mixed

with 15 mL of apple compote. Different drug guns were used for the two groups and all treatments were given as a reward after clinical observations and samples collection.



Figure 7. (a) Drug gun loaded with apple compote and apple juice ± valganciclovir. (b) Drug gun after treatment administration to ponies. A small volume of apple compote remains in the drug gun after each utilization and was estimated to be less than 10% of initial volume. One specific drug gun was affected for each group for the duration of the study.

Clinical observation

For all ponies, clinical signs and rectal temperature were recorded once a day from D-6 to D-1 and twice a day from D0 to D+21. A rectal temperature (RT) of >38.8 °C was regarded as fever. Behaviour (BV), nasal discharges (ND), coughing (CG), ocular discharges (OD), lymph node swelling (LN) and nervous disorders (ND) were monitored during each clinical examination. The order of passage of the ponies for the latter was random. A daily clinical score for each pony was defined using the scoring presented in Supplementary Table 2. The cumulative clinical score (CCS) was calculated each day using a formula adapted from the score for equine influenza virus infection in Welsh mountain ponies [40]:

$$CCS = RT + ND + 2 \times (CG) + LN + OD + BV + ND$$

Blood collection and processing

Blood samples were collected once a day by jugular venepuncture into EDTA (10 mL) from D+1 to D+20 and into dry tubes (10 mL) at D-5 and at D+1 to D+20 just before treatment administration. Serum was collected from dry tubes and frozen at -20 °C until used. Viral DNA extraction from 2 mL of EDTA blood sample was performed to determine cell-associated viremia using Nucleospin® Blood L kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from what remains of the EDTA tubes by density centrifugation using lymphocytes separation medium (Eurobio, Courtaboeuf, France). Cells were rinsed three times with phosphate buffered saline (Eurobio) and suspended in RPMI medium (Eurobio) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio), 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin B (Eurobio). PBMCs were counted using inverted microscope. 2.10^6 PBMC were collected and frozen at -20 °C for viral quantitation. Nucleic acids were extracted using QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. 1.10^6 other PBMCs were collected and seeded on rabbit kidney (RK13) monolayer cells on 6-wells plates. RK13 were cultivated in Minimum Essential Medium (MEM) with Earle's salts (Eurobio) complemented with 10% Fetal Bovine Serum (Eurobio), 1% L-glutamine (Eurobio), 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin B (Eurobio) at 37°C and 5% CO₂. After 5 days of co-cultivation, the number of plaques was counted and plates were frozen at -80 °C for viral quantitation. Nucleic acids were extracted using QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

Nasal swabs collection and processing

Nasopharyngeal samples were collected at D-5, D+1 to D+10, D+12, D+14, D+16, D+18 and D+20 using genital swabs. Swabs were inserted through the nostrils up to the nasopharynx alternating left and right nostril each day. Swabs were then placed directly into polypropylene tubes containing 3 mL of MEM with Earle's salts (Eurobio) complemented with 1% L-glutamine (Eurobio), 100 IU/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin B (Eurobio). Nasopharyngeal swabs were vortexed and centrifuged. Each nasopharyngeal secretion was clarified by centrifugation and 10-fold dilutions were prepared. Diluted samples were inoculated in triplicate on RK13 cells in 96-well plates and incubated at 37°C for 7 days. Wells with cytopathic effects were recorded and titre of each sample was determined using Karber method [39]. Medium was also collected for viral quantitation and nucleic acids were extracted using QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

Viral load quantitation

Quantitative PCR of EHV-1, EHV-4, EHV-2 and EHV-5 were realised as previously described [41]. Each reaction was processed in a total volume of 25 µL containing 2x Taqman® Universal Master Mix (Life Technologies, Villebon-surYvette, France), primers and probes using QuantStudio™ 12 K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies). Sequences of primers, probes and thermal cycling are described in Supplementary Table 3.

Serological analysis

Neutralising antibody assay was performed using the sera of all 8 ponies collected at D-5 and D+1 to D+20 according to the OIE method ([42]). Briefly, two-fold serial dilutions of each serum from 1:4 to 1:256 were performed in duplicate on 96-well plates using complemented MEM with Earle's salts (Eurobio). The EHV-1 strain KyD (ATCC® VR-700™) was added to each dilution at a concentration of 100 TCID₅₀/well and plates were incubated at 37°C for one hour. Virus and sera mixtures were then transferred on RK13 monolayer cells seeded in 96-well plates and incubated at 37°C and 5% CO₂. After 3 days of culture, cells monolayers were examined using an inverted microscope. The SN titre was estimated as the last dilution of serum neutralising the virus in both duplicates (no cytopathic effect formation).

Ganciclovir quantitation

GCV concentration in serum was determined in sera at D-5 and at D0 to D+20. After a freezing period at -20°C, sera were centrifuged at 5 000 rpm for 30 min. 500 µL of supernatant was recovered and evaporated using EZ-2 series GENEVAC during 150 min. 100 µL of acetonitrile with 0.1 % of formic acid were added in dry tubes, then 400 µL of high-purity water was added. Tubes were then incubated at room temperature for 30 min and filtered using 0.45 µm polychlorure vinyle filter. The ganciclovir concentration was determined using UHPLC-MS/MS 6495 (Agilent Technologies) with Acquity HSS column and Acquity HSS VANGUARD pre-column. A standard curve from 0.025 µg/mL to 1 µg/mL was used for GCV quantification. Deuterium marked ganciclovir (Toronto Research Chemicals) was used as internal-standard for the quantification of GCV.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed on StatGraphics® Centurion 224 XVI Version 16.1.12 for windows (StatPoint Technologies, Inc, Warrenton, VA, USA). Data were considered significant for p value <0.05.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Allen, G.P.; Kydd, J.H.; Slater, J.D.; Smith, K.C. Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections. **2004**, *38*.
- Lunn, D.P.; Davis-Poynter, N.; Flaminio, M.J.B.F.; Horohov, D.W.; Osterrieder, K.; Pusterla, N.; Townsend, H.G.G. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **2009**, *23*, 450–461, doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x.
- Kydd, J.H.; Smith, K.C.; Hannant, D.; Livesay, G.J.; Mumford, J.A. Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Vet. J.* **1994**, *26*, 470–473, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04052.x.
- Poelaert, K.C.K.; Van Cleemput, J.; Laval, K.; Favoreel, H.W.; Couck, L.; Van den Broeck, W.; Azab, W.; Nauwynck, H.J. Equine herpesvirus 1 bridges T-lymphocytes to reach its target organs. *Journal of Virology* **2019**, doi:10.1128/JVI.02098-18.
- Goodman, L.B.; Loregian, A.; Perkins, G.A.; Nugent, J.; Buckles, E.L.; Mercorelli, B.; Kydd, J.H.; Palù, G.; Smith, K.C.; Osterrieder, N.; et al. A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase Determines Neuropathogenicity. *PLoS Pathog* **2007**, *3*, e160, doi:10.1371/journal.ppat.0030160.
- Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.C.; Mumford, J.A.; Swann, Z.; Newton, J.R.; Bowden, R.J.; Allen, G.P.; Davis-Poynter, N. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *Journal of Virology* **2006**, *80*, 4047–4060, doi:10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006.
- Perkins, G.A.; Goodman, L.B.; Tsujimura, K.; Van de Walle, G.R.; Kim, S.G.; Dubovi, E.J.; Osterrieder, N. Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984–2007). *Vet. Microbiol.* **2009**, *139*, 375–378, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.033.
- Pronost, S.; Léon, A.; Legrand, L.; Fortier, C.; Miszczak, F.; Freymuth, F.; Fortier, G. Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Veterinary Microbiology* **2010**, *145*, 329–333, doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.031.
- Smith, K.L.; Allen, G.P.; Branscum, A.J.; Frank Cook, R.; Vickers, M.L.; Timoney, P.J.; Balasuriya, U.B.R. The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Veterinary Microbiology* **2010**, *141*, 5–11, doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.030.
- Sutton, G.; Garvey M.; Cullinane A.; Jourdan M.; Fortier C.; Moreau P.; Foursin M.; Gryspeerdt A.; Maisonnier V.; Marcillaud-Pitel C.; Legrand L.; Paillot R.; Pronost S. Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion. *Viruses* **2019**, *11*, 916, doi:10.3390/v11100916.
- Vissani, M.A.; Becerra, M.L.; Olgún Perglione, C.; Tordoya, M.S.; Miño, S.; Barrandeguy, M. Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Vet. Microbiol.* **2009**, *139*, 361–364, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.025.
- Paillot, R.; Sutton, G.; Thieulent, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Pronost, S. New EHV-1 variant identified 2020.
- 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**, *In Press*.

14. Kydd, J.H.; Lunn, D.P.; Osterrieder, K. Report of the Fourth International Havemeyer Workshop on Equid Herpesviruses (EHV) EHV-1, EHV-2 and EHV-5. *Equine Vet J* **2019**, *51*, 565–568, doi:10.1111/evj.13141.
15. Thieulent, C.; Hue, E.S.; Sutton, G.; Fortier, C.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Paillot, R.; Vidalain, P.-O.; et al. Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: Efficacy of decitabine and valganciclovir alone or in combination. *Antiviral Research* **2020**, *183*, 104931, doi:10.1016/j.antiviral.2020.104931.
16. Garre, B.; Gryspeerdt, A.; Croubels, S.; De Backer, P.; Nauwynck, H. Evaluation of orally administered valacyclovir in experimentally EHV1-infected ponies. *Veterinary Microbiology* **2009**, *135*, 214–221, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.062.
17. Maxwell, L.K.; Bentz, B.G.; Gilliam, L.L.; Ritchey, J.W.; Pusterla, N.; Eberle, R.; Holbrook, T.C.; McFarlane, D.; Rezabek, G.B.; Meinkoth, J.; et al. Efficacy of the early administration of valacyclovir hydrochloride for the treatment of neuropathogenic equine herpesvirus type-1 infection in horses. *American Journal of Veterinary Research* **2017**, *78*, 1126–1139, doi:10.2460/ajvr.78.10.1126.
18. Wilkins P.; Henninger R.; Reed S.; Piero F. Acyclovir as treatment for EHV-1 myeloencephalopathy. *49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* **2003**.
19. Friday, P.A.; Scarratt, W.K.; Elvinger, F.; Timoney, P.J.; Bonda, A. Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **2000**, *14*, 197–201.
20. Henninger, R.W.; Reed, S.M.; Saville, W.J.; Allen, G.P.; Hass, G.F.; Kohn, C.W.; Sofaly, C. Outbreak of Neurologic Disease Caused by Equine Herpesvirus-1 at a University Equestrian Center. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **2007**, *21*, 157–165.
21. Murray, M.J.; Piero, F.; Jeffrey, S.C.; Davis, M.S.; Furr, M.O.; Dubovi, E.J.; Mayo, J.A. Neonatal Equine Herpesvirus Type 1 Infection on a Thoroughbred Breeding Farm. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **1998**, *12*, 36–41, doi:10.1111/j.1939-1676.1998.tb00494.x.
22. 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. *Veterinary Microbiology* **2007**, *122*, 43–51, doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.004.
23. 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.; et al. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology* **2019**, *526*, 105–116, doi:10.1016/j.virol.2018.10.013.
24. Ahmed, A. Antiviral Treatment of Cytomegalovirus Infection. *IDDT* **2011**, *11*, 475–503, doi:10.2174/187152611797636640.
25. Biron, K.K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Research* **2006**, *71*, 154–163, doi:10.1016/j.antiviral.2006.05.002.
26. Faulds, D.; Heel, R.C. Ganciclovir: A Review of its Antiviral Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in Cytomegalovirus Infections. *Drugs* **1990**, *39*, 597–638, doi:10.2165/00003495-199039040-00008.
27. McGavin, J.K.; Goa, K.L. An Update of its Use in the Prevention of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Drugs* **2001**, *61*, 1153–1183.
28. Khoury, J.A.; Storch, G.A.; Bohl, D.L.; Schuessler, R.M.; Torrence, S.M.; Lockwood, M.; Gaudreault-Keener, M.; Koch, M.J.; Miller, B.W.; Hardinger, K.L.; et al. Prophylactic Versus Preemptive Oral

- Valganciclovir for the Management of Cytomegalovirus Infection in Adult Renal Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* **2006**, *6*, 2134–2143, doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01413.x.
29. Kimberlin, D.W.; Jester, P.M.; Sánchez, P.J.; Ahmed, A.; Arav-Boger, R.; Michaels, M.G.; Ashouri, N.; Englund, J.A.; Estrada, B.; Jacobs, R.F.; et al. Valganciclovir for Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease. *New England Journal of Medicine* **2015**, *372*, 933–943, doi:10.1056/NEJMoa1404599.
 30. Cvetkovic, R.S.; Wellington, K. Valganciclovir: A Review of its Use in the Management of CMV Infection and Disease in Immunocompromised Patients. *Drugs* **2005**, *65*, 859–878, doi:10.2165/00003495-200565060-00012.
 31. Carmichael, R.J.; Whitfield, C.; Maxwell, L.K. Pharmacokinetics of ganciclovir and valganciclovir in the adult horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **2013**, *36*, 441–449, doi:10.1111/jvp.12029.
 32. Garrett, D.; Montesso, F.; Fougerolle, S.; Lopez-Alvarez, M.R.; Birand, I.; De Bock, M.; Huang, C.M.; Legrand, L.; Pronost, S.; Paillot, R. Refinement of the equine influenza model in the natural host: A meta-analysis to determine the benefits of individual nebulisation for experimental infection and vaccine evaluation in the face of decreased strain pathogenicity. *Veterinary Microbiology* **2017**, *211*, 150–159, doi:10.1016/j.vetmic.2017.10.010.
 33. Goehring, L.S.; van Maanen, C.; Berendsen, M.; Cullinane, A.; de Groot, R.J.; Rottier, P.J.M.; Wesselingh, J.J.C.M.; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M. Experimental infection with neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) in adult horses. *The Veterinary Journal* **2010**, *186*, 180–187, doi:10.1016/j.tvjl.2009.08.007.
 34. Wilsterman, S.; Soboll-Hussey, G.; Lunn, D.P.; Ashton, L.V.; Callan, R.J.; Hussey, S.B.; Rao, S.; Goehring, L.S. Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet. Microbiol.* **2011**, *149*, 40–47, doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.004.
 35. Pusterla, N.; Mapes, S.; Wilson, W.D. Diagnostic sensitivity of nasopharyngeal and nasal swabs for the molecular detection of EHV-1. *Veterinary Record* **2008**, *162*, 520–521, doi:10.1136/vr.162.16.520.
 36. Pusterla, N.; Wilson, W.D.; Mapes, S.; Finno, C.; Isbell, D.; Arthur, R.M.; Ferraro, G.L. Characterization of viral loads, strain and state of equine herpesvirus-1 using real-time PCR in horses following natural exposure at a racetrack in California. *Vet. J.* **2009**, *179*, 230–239, doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.018.
 37. Moher, D.; Hopewell, S.; Schulz, K.F.; Montori, V.; Gøtzsche, P.C.; Devereaux, P.J.; Elbourne, D.; Egger, M.; Altman, D.G. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* **2010**, *340*, c869, doi:10.1136/bmj.c869.
 38. Schulz, K.F.; Altman, D.G.; Moher, D.; CONSORT Group. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *PLoS Med.* **2010**, *7*, e1000251, doi:10.1371/journal.pmed.1000251.
 39. Ramakrishnan, M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology* **2016**, *5*, 85, doi:10.5501/wjv.v5.i2.85.
 40. Paillot, R.; Prowse, L.; Donald, C.; Medcalf, E.; Montesso, F.; Bryant, N.; Watson, J.; Jeggo, M.; Elton, D.; Newton, R.; et al. Efficacy of a whole inactivated EI vaccine against a recent EIV outbreak isolate and comparative detection of virus shedding. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2010**, *136*, 272–283, doi:10.1016/j.vetimm.2010.03.019.
 41. Doubli-Bounoua, N.; Richard, E.A.; Léon, A.; Pitel, P.-H.; Pronost, S.; Fortier, G. Multiple molecular detection of respiratory viruses and associated signs of airway inflammation in racehorses. *Viol. J.* **2016**, *13*, 197, doi:10.1186/s12985-016-0657-5.

42. OIE *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres 2019*. Chapitre 3.5.9. *Equine rhinopneumonitis (infection with equid herpesvirus-1 and -4)*; 2018;



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article en préparation

Supplementary Table 1: Summary of the experimental protocol

Day from virus inoculation	-41	-28	-10	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	+11	+12	+13	+14	+15	+16	+17	+18	+19	+20	+21			
Weighing	x		x																															
Virus inoculation (FR-56628; 5.10 ⁷ TCID ₅₀)										x																								
Clinical signs evaluation (twice a day)			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Serum sample (once a day)		x			x						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
PBMC isolation (once a day)											x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Nasopharyngeal swab collection (once a day)					x						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
VGCV treatment 01*										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
VGCV treatment 02*										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
VGCV treatment 03*										x																								
Euthanasia and post-mortem collection																																		†

*: treated group only

Supplementary Table 2: Description of the clinical signs score

Clinical signs	Score	Description
Attitude	0	Normal
	1	Quiet and nearly lethargic
	2	Severe depression
Rectal temperature	0	Normale (≤ 38.8 °C)
	1	Low fever (> 38.8 °C to ≤ 39.4 °C)
	2	Moderate fever (>39.4 °C to ≤ 40.0 °C)
	3	Severe fever (> 40.0 °C)
Nasal discharge	0	No discharge
	1	Slightly and unilateral discharge
	2	Slightly and bilateral discharge
	3	Abundant and bilateral discharge or abundant and unilateral muco-purulent discharge
	4	Abundant and bilateral muco-purulent discharge
Cough	0	No coughing
	1	Coughing once during 30 min.
	2	Coughing two or more times during 30 min.
Ocular discharge	0	No discharge
	1	Slightly to moderate discharge
	2	Abundant discharge
Mandibular lymph node	0	Barely palpable
	1	Green peas-sized
	2	Bean-sized
	3	nuts sized

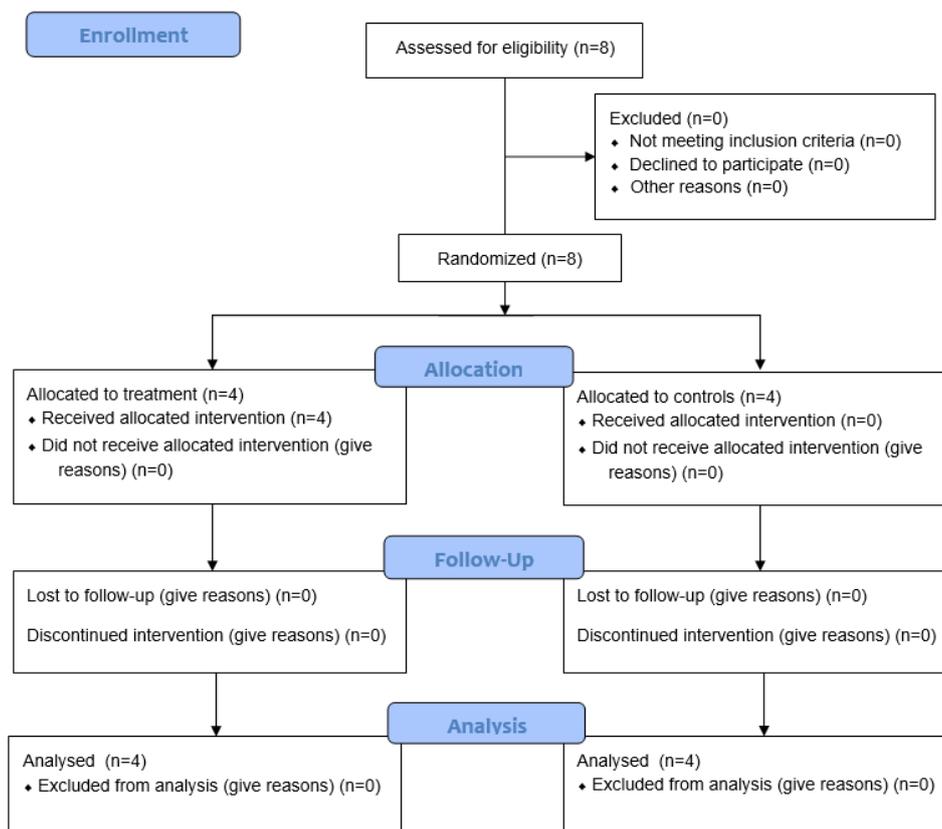
Supplementary Table 3: Amplification conditions for viruses detection by PCR

Virus	Target gene	Primers and probe sequences (5'-3')	Product size (bp)	Thermoprofile	Reference
EHV-1	gB	F: CATGTCAACGCACTCCCA	63	95 °C (10 min.)	x45 (Diallo et al., 2006)
		R: GGGTCGGGCGTTTCTGT		95 °C (15 sec.)	
		P: FAM-CCCTACGCTGCTCC-MGB-NFQ		62°C (1 min.)	
EHV-4	gB	F: GGGCTATTGGATTACAGCGAGAT	58	95 °C (10 min.)	x45 (Diallo et al., 2007)
		R: TAGAATCGGAGGGCGTGAAG		95 °C (15 sec.)	
		P: VIC-CAGCGCCGTAACCAG-MGB-NFQ		60°C (1 min.)	
EHV-2	gB	F: CCTCAACCTGACTGACATACCCA	100	95 °C (10 min.)	x45 (Brault et al., 2010)
		R: TTTAGAATAGAGCTCAATCACCTAAAATC		95 °C (15 sec.)	
		P: FAM-CACCATGATTACCCTGAACCTGTCTCTGGT-BHQ1		60°C (1 min.)	
EHV-5	gB	F: AACCCGCCGTGCATCA	66	95 °C (10 min.)	x45 (Hue et al., 2014)
		R: AGGCGCCACACACCCTAA		95 °C (15 sec.)	
		P: FAM-ACAACACCACCAACCCCTTCTGCTG-BHQ1		60°C (1 min.)	
EIV	M	F: AGATGAGYCTTCTAACCGAGGTCG	102	95 °C (10 min.)	x45 (Heine et al., 2007)
		R: TGCAAANACATCYTCAAGTCTCTG		95 °C (15 sec.)	
		P: FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1		60°C (1 min.)	

Supplementary Figure 1: CONSORT Flow Diagram



CONSORT 2010 Flow Diagram: Oral administration of valganciclovir reduces clinical signs, virus shedding and viremia in ponies experimentally infected with the new variant C₂₂₅₄ of equid herpesvirus-1



3.4. Résultats et discussion

La souche FR-56628 a été utilisée lors de l'infection expérimentale réalisée sur 8 poneys dont 4 ont reçu le traitement au VGCV. Il était important de vérifier que les doses injectées étaient bien métabolisées chez les animaux traités. Une concentration plasmatique de GCV supérieure à son EC_{50} déterminée *in vitro* (0,153 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contre cette même souche (Thieulent et al., 2020a : article 2) a été mesurée durant toute la durée du traitement. Ce résultat montre que tous les poneys ont bien métabolisé le VGCV et que la dose administrée est suffisante. De plus, le processus de préparation du traitement : dilution du VGCV dans du jus de pomme, mélange avec de la compote de pomme et utilisation d'un pistolet drogueur, est également adapté. Aucun effet indésirable n'a été noté suite à l'administration du traitement, suggérant que cette dose de VGCV est bien tolérée par les poneys et confirmant les résultats précédemment obtenus avec une seule dose de VGCV (Carmichael et al., 2013). Aucun anticorps neutralisant l'HVE-1 n'a été détecté au cours des 4 semaines précédant l'infection et la séroconversion a été observée chez tous les poneys entre D+10 et D+14, période classiquement décrite pour mesurer la séroconversion (Hartley et al., 2005).

Concernant les signes cliniques, le traitement a permis de réduire de façon significative la durée de la fièvre, la durée et l'amplitude de l'excrétion virale, ainsi que la sévérité de la toux. Aucun effet bénéfique n'a été observé sur l'hypertrophie des ganglions submandibulaires, sur l'abondance des sécrétions oculaire et sur le comportement général des poneys. La sévérité du score clinique total (voir matériels et méthodes : article 5) a été significativement diminuée chez les poneys traités. Aucun des chevaux n'a eu de signes cliniques évocateurs de la forme nerveuse, comme cela a été le cas lors de l'isolement de la souche au cours de l'épizootie de 2018. Ceci peut être dû à l'âge des animaux. En effet, il est décrit que les formes nerveuses de la maladie sont préférentiellement rencontrées chez les chevaux âgés (Lunn et al., 2009).

Le traitement n'a pas permis de réduire de manière significative l'excrétion virale lorsqu'elle est mesurée par qPCR. Cependant, le nombre de particules virales infectieuses excrétées a été significativement réduit durant toute la durée du traitement. Aucune particule virale infectieuse n'a été détectée par culture cellulaire chez l'ensemble des poneys à partir D+14, ce qui est probablement lié à la présence d'un fort taux d'anticorps neutralisants. La présence d'ADN viral a cependant été détectée durant toute la durée de l'expérience par qPCR. Les résultats positifs

obtenus en qPCR à partir de D+14 semblent correspondre à la présence de particules d'HVE-1 non infectieuses. Pour démontrer cela, il serait intéressant de faire cohabiter des poneys non infectés avec les poneys infectés aux différents stades de l'infection afin de déterminer à partir de quelle dose le virus est infectieux comme cela a pu être réalisé pour le virus de la grippe équine (Garrett et al., 2017). Cette expérience devrait être réalisée avec un nombre minimum de poneys pour chaque stade afin de ne pas être tributaire de l'aspect individuel, en particulier en ce qui concerne le système immunitaire. Du jetage nasal mucopurulent a été observé chez tous les poneys contrôles entre D+4 et D+11, tandis que seuls 3 poneys traités ont présenté du jetage mucopurulent sur une période d'un à deux jours entre D+4 et D+9. Ces résultats montrent que le traitement a permis de réduire de façon significative les signes cliniques respiratoires et l'excrétion de particules virales infectieuses.

La virémie, mesurée par quatre approches différentes, a été réduite de façon significative. Ces quatre approches comprenaient i) la quantification du nombre de particules d'HVE-1 dans 2 mL de sang, ii) la quantification du nombre de particules d'HVE-1 dans 2.10^6 PBMCs, iii) un suivi au microscope de co-cultures comprenant 1.10^6 PBMCs sur des cellules RK13 et iv) la quantification du nombre de copies génome d'HVE-1 produits à partir de 1.10^6 PBMCs mis en co-culture sur des cellules RK13. La mise en place de la virémie a pu être observée entre D+3 et D+4, soit 2 à 3 jours après l'apparition des premiers signes cliniques. Cela signifie que nous avons quelques jours pour commencer l'administration du traitement, car le virus n'est pas encore présent dans le sang. On sait que le degré de virémie est un facteur important dans le développement des formes secondaires graves et un traitement qui réduit par conséquent la virémie est souhaité. Au cours de cette étude, la virémie a été considérablement diminuée chez les poneys traités par rapport aux poneys témoins. Ainsi, nous suggérons qu'un traitement au VGCV, réalisé de façon précoce, pourrait constituer une stratégie efficace pour limiter la dissémination du virus et donc l'apparition des formes secondaires graves.

Cette étude a démontré qu'un traitement au VGCV permet de réduire les signes cliniques, l'excrétion de particules virales infectieuses et la virémie cellulaire de manière significative chez des poneys infectés par voie intranasale avec la souches d'HVE-1 FR-56628. Bien qu'il ne permette pas de réduire pleinement la virémie cellulaire, le VGCV pourrait constituer à l'heure actuelle le meilleur traitement antiviral à utiliser sur le terrain en complément de la vaccination pour lutter

contre les formes graves induites par l'HVE-1. Nous n'avons pas observé au cours de cette infection expérimentale de spécificité liée à la souche C₂₂₅₄ (FR-56628).

Chapitre 4 :

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'herpèsvirus équin-1 (HVE-1) est considéré comme l'un des virus provoquant les plus importantes pertes économiques dans la filière équine, notamment avec les avortements et les troubles nerveux qu'il induit. Chaque année des foyers infectieux à HVE-1 surviennent en France et dans le monde malgré l'existence de vaccins. Si l'efficacité des vaccins pourrait être améliorée, ceux-ci ont montré une bonne activité pour réduire les troubles respiratoires et l'excrétion virale. L'introduction de ces vaccins dans les années 1960 a notamment permis de réduire le nombre de foyers de rhinopneumonie et a mis fin au phénomène d'« abortion storm » dans la plupart des pays. Cependant de nombreux foyers de myéloencéphalopathie à HVE-1 sont encore rapportés chaque année dans le monde (<https://app.jshiny.com/jdata/icc/iccview>). Face à ces limitations, les acteurs de la filière équine se tournent de plus en plus vers des traitements alternatifs et l'utilisation de molécules antivirales semblent constituer une piste d'avenir pour lutter contre les formes graves. Cependant, très peu de molécules antivirales ont été étudiées *in vitro* contre ce virus (Vissani et al., 2015 ; Maxwell et al., 2017). Parmi elles, seule l'aciclovir (ACV) a fait l'objet d'études expérimentales chez l'espèce cible sans démontrer d'effet probant (Garre et al., 2009 ; Maxwell et al., 2017). En l'absence de traitement efficace, le panel de molécules antivirales proposé aux acteurs de la filière équine est aujourd'hui réduit à seulement quelques molécules. La recherche de molécules par repositionnement est une stratégie intéressante de plus en plus employée en biologie dans différents domaines et notamment en oncologie (Jourdan et al., 2020). En l'absence d'autorisation de mise sur le marché français de traitement par les antiviraux pour les maladies équines, cette stratégie présente un fort intérêt contre l'HVE-1.

Ce travail de thèse a montré en premier lieu l'efficacité du système RTCA xCELLigence® pour suivre en temps réel l'infection cellulaire par plusieurs herpèsvirus équins, dont l'HVE-1 (Thieulent et al 2019 ; article 1). Les résultats obtenus sur notre modèle cellulaire avec les HVE- 1, -3 et -4 montrent clairement que ce système d'analyse est pertinent pour l'étude de l'ensemble des virus provoquant une altération du tapis cellulaire, et ce, sans provoquer une diminution de la viabilité cellulaire comme précédemment décrit (Turowska et al., 2010, Scrochi et al., 2017). Nous avons également fait la preuve de concept que ce système était adapté au criblage d'un grand nombre de molécules au format 96 puits. Afin d'analyser ces résultats, nous avons développé un arbre décisionnel tout en prenant en compte les éventuels biais. Il est basé sur le calcul des critères de sélectivité suivants : aire sous la courbe (AUC) et temps requis pour réduire le Cell Index de moitié

(CIT₅₀). Ces critères ont été fixés au regard de notre modèle d'étude et sont adaptables à l'étude d'autres alphaherpèsvirus. Des travaux préliminaires réalisés sur un gammaherpèsvirus équin, l'HVE-2, ne nous ont cependant pas permis de suivre l'infection de ce virus sur cellules ED. Notre hypothèse principale pour expliquer ce résultat repose sur la faible vitesse de multiplication de ce virus sur cellules ED. L'utilisation d'un modèle cellulaire plus adapté et l'optimisation des conditions d'analyse permettrait de suivre l'effet de l'HVE-2 *in vitro*. Cela démontre que bien que cette technologie semble adaptable à l'ensemble des virus, les conditions expérimentales doivent être revues selon les modèles. Comme tous les couples cellules/virus utilisés en laboratoire sont uniques, une modification des seuils d'AUC et de CIT₅₀ est requise pour chacun d'entre eux. D'autres études ont également été conduites avec cette technologie au sein de notre laboratoire sur l'artérite virale équine (non publiés) et sur le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (Saade et al., 2020). Ce système a également été utilisé pour l'étude d'alphavirus (Zandi et al., 2016, MArlina et al., 2015), d'entérovirus (Teng et al., 2013) et de flavivirus (Charretier et al., 2018).

La seconde partie de ce travail consistait en l'application de la technologie RTCA xCELLigence® au criblage à moyen/haut débit d'environ 3 000 molécules contre l'HVE-1. En effet, seule une vingtaine de molécules avaient été testés *in vitro* contre l'HVE-1 avant notre étude (Introduction : partie 7). Avec la possibilité de suivre simultanément et de façon indépendante 6 plaques 96 puits, cette technologie s'est révélée idéale pour la réalisation de ce criblage. Elle a d'ailleurs été préalablement utilisée pour le criblage à haut débit de presque 120 000 molécules dans le but de trouver de nouveaux composés antimétaboliques (Ke et al., 2010). L'exhaustivité des données de notre criblage sera bientôt ouverte à l'ensemble de la communauté scientifique avec la publication de l'article 3 (Thieulent et al., 2020b : soumis) dans le journal Data in Brief. L'apport de ces données est important et pourra notamment servir aux équipes travaillant sur les herpèsvirus en médecine vétérinaire et humaine. En effet, ces données apportent des informations prédictives sur l'efficacité potentielle des molécules testées dans notre étude contre d'autres herpèsvirus.

Sur la base des 21 molécules ayant montré une bonne efficacité contre l'HVE-1 suite à ce criblage (Thieulent et al., 2020a ; Article 2), 8 molécules ont été sélectionnées pour leur activité optimale. L'ACV et le ganciclovir (GCV), font partie de ces molécules retenues et confirment les résultats précédemment obtenus (Thieulent et al., 2019 ; article 1). L'aphidicoline, l'idoxuridine, le

pritelivir et le valganciclovir (VGCV) sont quant à elles connues pour être efficaces contre des herpèsvirus humains. L'aphidicholine et l'idoxuridine ont précédemment été décrites comme efficaces contre l'HVE-1 (De Clerq 1984, Goodman 2007), ce qui « conforte » les résultats obtenus lors du criblage par la technologie RTCA xCELLigence®. Nous avons identifié la classe des analogues de désoxycytidine comme présentant un fort effet antiviral contre l'HVE-1. Celle-ci comprend la cytarabine, la décitabine (DTB) et la gemcitabine. Parmi ces dernières, la DTB s'est montrée la plus efficace quels que soient le modèle cellulaire et les souches d'HVE-1 utilisés.

Comme l'HVE-1 n'est pas le seul herpèsvirus impactant l'espèce équine, il s'avère très intéressant d'évaluer l'effet de ces molécules contre d'autres herpèsvirus équins. Des travaux ont d'ailleurs été réalisés sur les HVE-8 et HVE-9 au laboratoire, et ont montré des résultats comparables à ceux obtenus avec l'HVE-1 (data non publiées). Des travaux seront également réalisés sur l'HVE-4 dans le cadre de la thèse de Camille Normand intitulée « Infections respiratoires à HVE-4 : caractérisation pour une prophylaxie optimale » qui feront suite à des résultats préliminaires encourageants. Dans le cas où un traitement s'avèrerait efficace *in vitro*, l'utilisation des molécules d'intérêt serait à envisager contre les formes graves aujourd'hui suspectées d'être induites par ce virus. Par ailleurs, comme l'HVE-1 et l'HVE-4 se comportent différemment sur de nombreux modèles cellulaires, l'évaluation de molécules antivirales contre l'HVE-4 constitue un très bon modèle d'étude comparée afin de mieux comprendre les différents mécanismes d'action. L'HVE-3, responsable de l'exanthème coïtal et sévissant fortement en Amérique du sud, s'avère également être une cible intéressante pour un traitement antiviral (Vissani, communication personnelle). Comme ce virus provoque des atteintes cutanées au niveau de la sphère génitale, l'utilisation d'une de ces molécules serait à envisager sous forme de pommade. La recherche de molécules antivirales est également un enjeu majeur pour d'autres herpèsvirus d'intérêt vétérinaire (Thomassy and Maggs, 2016). Dans un concept One Health, évaluer l'ensemble des molécules d'intérêt identifiées lors de ces travaux contre le BoHV-1, le GaHV-2 ou encore le FeHV-1 pourrait constituer une piste à explorer. Si un traitement antiviral ne peut néanmoins être considéré contre l'ensemble de ces virus à cause du coût important, une étude *in vitro* présente un fort intérêt scientifique pour la compréhension des différents mécanismes d'action.

Parmi les molécules les plus efficaces, la DTB présente de nombreux avantages, elle est efficace *in vitro* sur l'ensemble des modèles cellulaires testés, elle montre un très bon effet synergique *in vitro* avec le VGCV, quel que soit le modèle mathématique d'étude utilisé, et possède un mécanisme d'action différent du VGCV. Son effet, ainsi que ceux des autres analogues de déoxycytidine, sera investigué au laboratoire contre plusieurs herpèsvirus humains, tels que l'HSV-1 (HHV-1) et le VZV (HHV-3). La mise en place du suivi de ces virus sur cellules VERO et MRC-5 avec le système RTCA xCELLigence® est actuellement en cours d'investigation au laboratoire. En fonction des résultats obtenus, il faudra ensuite étendre le nombre de virus à étudier afin de caractériser au mieux son spectre d'action. Des études de combinaison entre le VGCV et la DTB sont par ailleurs à prévoir en fonction des résultats obtenus avec la DTB.

Une seconde phase de validation des molécules d'intérêt sur des modèles *ex vivo* de cultures d'explants de trachées équine et sur cellules primaires épithéliales respiratoires équine (EREC) présente de nombreux avantages. L'utilisation de ces modèles est très intéressante afin de confirmer ou non les résultats obtenus sur lignées cellulaires avant d'envisager des études *in vivo* chez l'espèce cible. Ces modèles de culture ont déjà été utilisés précédemment pour évaluer l'effet de molécules antivirales et semblent d'ailleurs plus adaptés que la culture sur lignée cellulaire pour prédire les effets observés *in vivo* (Glorieux et al., 2012). Durant ma deuxième année de thèse, j'ai eu l'opportunité d'être formé à la culture de ces modèles au sein du laboratoire de virologie vétérinaire du professeur Hans Nauwynck (Université de Ghent, Belgique). J'ai ainsi pu transposer ces deux modèles de culture au sein de la plateforme Normandie Equine Vallée, site de Saint-Contest. La culture de ces modèles reste néanmoins longue et fastidieuse et n'a pas pu être totalement finalisée, principalement à cause du manque de temps et de la difficulté d'approvisionnement en tissus équins sains et frais. Ce travail sera poursuivi au laboratoire avec notamment la validation des étapes d'immunomarquage du virus.

Nos résultats obtenus *in vitro* (Thieulent et al., 2019 ; Thieulent et al., 2020a, Thieulent et al., 2020b), les résultats de la littérature (Garre et al., 2008, Azab et al., 2010), les données pharmacocinétiques (Carmichael et al., 2012) et l'absence de traitement efficace *in vivo* (Garre et al., 2009, Maxwell et al., 2017) nous ont conduit à tester l'effet du VGCV sur des poneys expérimentalement infectés par l'HVE-1 (Thieulent et al., en rédaction : Article 5). Au cours de cette étude, nous avons montré que le traitement permet de réduire l'ensemble des signes cliniques,

l'excrétion virale et la virémie. Les résultats obtenus montrent donc l'intérêt d'utiliser un traitement au VGCV lors de foyers infectieux à HVE-1. De plus, ces résultats montrent que ce dernier est plus efficace qu'un traitement au valaciclovir (VACV) (Garre et al., 2009), qui était considéré jusque-là comme le traitement de premier choix contre les infections à HVE-1.

Nous avons également mis en évidence un très bon effet synergique *in vitro* entre le VGCV et la DTB (article 2). L'association de ces 2 molécules *in vivo* pourrait être envisagée. Pour cela, il sera pertinent d'étudier la pharmacocinétique et la toxicité de la DTB sur modèle équin. L'étude de ces paramètres est prévue dans le cadre du consortium SAVE avec le projet « SAVE Satellite ». Celui-ci prévoit tout d'abord d'évaluer la stabilité métabolique de la DTB sur microsomes de foie équin et d'évaluer sa toxicité sur modèle équin. Dans l'hypothèse où la DTB présenterait des paramètres pharmacocinétiques intéressants *in vitro* et une absence d'effet toxique, il faudrait réaliser en premier lieu une étude pharmacocinétique sur modèle équin afin de déterminer la dose de DTB à administrer puis d'envisager une infection expérimentale sur ce même modèle. Cette dernière devra être constituée idéalement de quatre groupes distincts : un groupe contrôle de poneys infectés, un groupe de poneys infectés traités à la DTB, un groupe de poneys infectés traités au VGCV et un groupe de poneys infectés traités simultanément à la DTB et au VGCV. Une étude de cette taille s'avèrerait cependant très coûteuse et la réalisation d'une étude comprenant seulement un groupe infecté contrôle et un groupe infecté traité au VGCV et à la DTB serait plutôt envisageable. En reproduisant les conditions expérimentales de l'article 5, cette étude permettrait d'évaluer l'effet anti-HVE-1 de la DTB directement sur le modèle équin et ainsi de valider ou non son effet synergique avec le VGCV. Cette combinaison de molécules pourrait permettre de réduire de façon plus conséquente la virémie cellulaire et ainsi prévenir l'apparition de l'ensemble des formes graves. Par ailleurs, nous avons démontré que l'effet antiviral de la DTB est inhibé par la présence de désoxycytidine (Thieulent et al., 2020a ; Article 2). Il sera donc intéressant d'évaluer la concentration sanguine de désoxycytidine libre et présente dans les PBMCs, afin de déterminer avec précision la concentration de DTB à administrer.

Par ailleurs, de plus en plus de souches d'herpèsvirus humains présentent des résistances aux antiviraux classiques, tels que l'ACV et le GCV (Piret and Boivin, 2016, Razonable, 2018). Dans ce contexte, l'utilisation d'analogues de désoxycytidine, qui semblent uniquement activés par des kinases cellulaires, pourrait permettre de lutter efficacement contre ces souches résistantes. Dans

l'hypothèse où les traitements antiviraux seraient de plus en plus utilisés en médecine vétérinaire, l'émergence de souches d'HVE-1 résistantes au VGCV demeure probable. Ainsi, évaluer l'effet de la DTB contre des souches d'HVE-1 mutantes en thymidine kinase permettrait de confirmer son mode d'activation et d'anticiper ce risque. Des souches d'HVE-1 et d'HVE-4 de ce type ont déjà été construites en laboratoire (Azab et al., 2010) et pourraient être utilisées. A notre connaissance, aucune étude n'a étudié la prévalence de souches d'HVE-1 circulantes présentant les mutations décrites chez les herpèsvirus humains comme induisant une résistance au GCV.

Lors de ces travaux, nous avons identifié une souche d'HVE-1 (FR-56628) présentant une mutation jamais décrite au préalable. Celle-ci se caractérise par la présence d'une cytosine en position 2254 (C₂₂₅₄) du gène l'ADN polymérase virale (Paillot et al., 2020, article 4). Nous avons pu montrer que cette souche induit des symptômes similaires aux souches circulantes (Thieulent et al., en rédaction : Article 5). De plus, nous avons démontré que cette mutation n'impactait pas l'efficacité des molécules antivirales testées (Thieulent et al., 2020a ; Article 2). Ces travaux montrent une fois de plus que l'importance du polymorphisme en position 2254 du gène de l'ADN polymérase de l'HVE-1 a peut-être été surévaluée.

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de faire avancer la recherche dans le domaine des antiviraux en santé équine avec la découverte d'un grand nombre de composés efficaces contre l'HVE-1. Par ailleurs, l'étude expérimentale réalisée permet de démontrer qu'un traitement au VGCV est à l'heure actuelle le meilleur traitement pour lutter contre ce virus. La découverte de l'effet anti-HVE-1 de la DTB couplée à son effet synergique avec le VGCV, ouvre de nouvelles perspectives dans la lutte contre l'ensemble des herpèsvirus. Bien que les études de combinaisons aient été réalisées au cours de ces travaux avec des associations de seulement deux composés, des combinaisons à trois composés, plus complexes à réaliser, permettraient de proposer un cocktail de molécules capables de combattre de façon toujours plus efficace les herpèsvirus équins.

Chapitre 5 :

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackermann, M., 2006. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Veterinary Microbiology* 113, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.008>
- Allaudeen, H.S., Kozarich, J.W., Bertino, J.R., De Clercq, E., 1981. On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78, 2698–2702. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.5.2698>
- Allen, G.P., 2008. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *Am. J. Vet. Res.* 69, 1595–1600. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.12.1595>
- Allen, G.P., 2006. Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. *Am. J. Vet. Res.* 67, 1401–1405. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.8.1401>
- Allen, G.P., 2002. Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4 (28-Feb-2002). International Veterinary Information Service.
- Allen, G.P., Bolin, D.C., Bryant, U., Carter, C.N., Giles, R.C., Harrison, L.R., Hong, C.B., Jackson, C.B., Poonacha, K., Wharton, R., Williams, N.M., 2008. Prevalence of latent, neuropathogenic equine herpesvirus-1 in the Thoroughbred broodmare population of central Kentucky. *Equine Veterinary Journal* 40, 105–110. <https://doi.org/10.2746/042516408X253127>
- Allen, G.P., Bryans, J.T., 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 2, 78–144.
- Allen, G.P., Kydd, J.H., Slater, J.D., Smith, K.C., 2004. Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections. *Infectious Diseases of Livestock* 829–859.
- Anderson, K., Goodpasture, E.W., 1942. Infection of Newborn Syrian Hamsters with the Virus of Mare Abortion (Dimock and Edwards). *Am. J. Pathol.* 18, 555–561.
- Andrei, G., Sienaert, R., McGuigan, C., Clercq, E.D., Balzarini, J., Snoeck, R., 2005. Susceptibilities of Several Clinical Varicella-Zoster Virus (VZV) Isolates and Drug-Resistant VZV Strains to Bicyclic Furano Pyrimidine Nucleosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 1081–1086. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1081-1086.2005>
- Andrei, G., Topalis, D., Fiten, P., McGuigan, C., Balzarini, J., Opdenakker, G., Snoeck, R., 2012. In Vitro-Selected Drug-Resistant Varicella-Zoster Virus Mutants in the Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes Yield Novel Phenotype-Genotype Associations and Highlight Differences between Antiherpesvirus Drugs. *Journal of Virology* 86, 2641–2652. <https://doi.org/10.1128/JVI.06620-11>
- Ashburn, T.T., Thor, K.B., 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3, 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>
- Avery, R.K., Arav-Boger, R., Marr, K.A., Kraus, E., Shoham, S., Lees, L., Trollinger, B., Shah, P., Ambinder, R., Neofytos, D., Ostrander, D., Forman, M., Valsamakis, A., 2016. Outcomes in Transplant Recipients Treated With Foscarnet for Ganciclovir-Resistant or Refractory Cytomegalovirus Infection: Transplantation 100, e74–e80. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001418>
- Awan, A.R., Chong, Y.C., Field, H.J., 1990. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 5), 1131–1140. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-5-1131>
- Awan, A.R., Gibson, J.S., Field, H.J., 1991. A murine model for studying EHV-1-induced abortion. *Res. Vet. Sci.* 51, 94–99. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(91\)90038-p](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90038-p)

- Ayisi, N.K., De Clercq, E., Wall, R.A., Hughes, H., Sacks, S.L., 1984. Metabolic fate of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in herpes simplex virus- and mock-infected cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26, 762–765. <https://doi.org/10.1128/AAC.26.5.762>
- Azab, W., 2019. Mononuclear cells drive herpesvirus type (EHV-1) to the endothelium: viral genes and cellular molecules influencing viral pathogenesis.
- Azab, W., Lehmann, M.J., Osterrieder, N., 2013. Glycoprotein H and 4 1 Integrins Determine the Entry Pathway of Alphaherpesviruses. *Journal of Virology* 87, 5937–5948. <https://doi.org/10.1128/JVI.03522-12>
- Azab, W., Tsujimura, K., Kato, K., Arai, J., Morimoto, T., Kawaguchi, Y., Tohya, Y., Matsumura, T., Akashi, H., 2010. Characterization of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 4 and in vitro susceptibility of the virus to antiviral agents. *Antiviral Research* 85, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.007>
- Azab, W., Zajic, L., Osterrieder, N., 2012. The role of glycoprotein H of equine herpesviruses 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) in cellular host range and integrin binding. *Vet Res* 43, 61. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-61>
- Balasuriya, U.B.R., Crossley, B.M., Timoney, P.J., 2015. A review of traditional and contemporary assays for direct and indirect detection of *Equid herpesvirus 1* in clinical samples. *J VET Diagn Invest* 27, 673–687. <https://doi.org/10.1177/1040638715605558>
- Balzarini, J., De Clercq, E., 1991. 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate synthetase converts the acyclic nucleoside phosphonates 9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine and 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine directly to their antivirally active diphosphate derivatives. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 8686–8689.
- Bang, F.B., Niven, J.S.F., 1958. A study of infection in organised tissue cultures. *National Institute for medical research* 317–322.
- Barski, G., Kourilsky, R., Cornefert, F., 1957. Resistance of Respiratory Ciliated Epithelium to Action of Polio and Adeno Viruses in vitro. *Experimental Biology and Medicine* 96, 386–391. <https://doi.org/10.3181/00379727-96-23485>
- Baunassie, A., 2019. Etude de la stabilité de l'herpèsvirus équin de type 1 dans le milieu extérieur en relation avec le contexte météorologique. *Faculté de médecine de Nantes*.
- Baxi, M.K., Borchers, K., Bartels, T., Schellenbach, A., Baxi, S., Field, H.J., 1996. Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model. *Virus Research* 40, 33–45. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)01255-9](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)01255-9)
- Baxi, M.K., Efstathiou, S., Lawrence, G., Whalley, J.M., Slater, J.D., Field, H.J., 1995. The detection of latency-associated transcripts of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. *Journal of General Virology* 76, 3113–3118. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-12-3113>
- Bentz, B.G., Maxwell, L.K., Erkert, R.S., Royer, C.M., Davis, M.S., MacAllister, C.G., Clarke, C.R., 2006. Pharmacokinetics of Acyclovir after Single Intravenous and Oral Administration to Adult Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 589–594. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb02901.x>
- Bernstein, D.I., Bravo, F.J., Clark, J.R., Earwood, J.D., Rahman, A., Glazer, R., Cardin, R.D., 2011. N-Methanocarbathymidine is more effective than acyclovir for treating neonatal herpes simplex virus infection in guinea pigs. *Antiviral Research* 92, 386–388. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.08.021>

- Bernstein, D.I., Bravo, F.J., Pullum, D.A., Shen, H., Wang, M., Rahman, A., Glazer, R.I., Cardin, R.D., 2015. Efficacy of *N*-methanocarbothymidine against genital herpes simplex virus type 2 shedding and infection in guinea pigs. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 24, 19–27. <https://doi.org/10.1177/2040206614566581>
- Biron, K.K., Harvey, R.J., Chamberlain, S.C., Good, S.S., Smith, A.A., Davis, M.G., Talarico, C.L., Miller, W.H., Ferris, R., Dornsife, R.E., Stanat, S.C., Drach, J.C., Townsend, L.B., Koszalka, G.W., 2002. Potent and Selective Inhibition of Human Cytomegalovirus Replication by 1263W94, a Benzimidazole *l*-Riboside with a Unique Mode of Action. *AAC* 46, 2365–2372. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2365-2372.2002>
- Biswas, S., Field, H.J., 2008. Herpes Simplex Virus Helicase—Primase Inhibitors: Recent Findings from the Study of Drug Resistance Mutations. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 19, 1–6.
- Borchers, K., Frölich, K., 1997. Antibodies against equine herpesviruses in free-ranging mountain zebras from Namibia. *J. Wildl. Dis.* 33, 812–817. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-33.4.812>
- Boyd, M.R., Bacon, T.H., Sutton, D., 1988. Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine (BRL 39123) in animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32, 358–363. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.3.358>
- Boyd, M.R., Bacon, T.H., Sutton, D., Cole, M., 1987. Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxy-methylbut-1-yl) guanine (BRL 39123) in cell culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31, 1238–1242.
- Bresgen, C., Lämmer, M., Wagner, B., Osterrieder, N., Damiani, A.M., 2012. Serological responses and clinical outcome after vaccination of mares and foals with equine herpesvirus type 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) vaccines. *Veterinary Microbiology* 160, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.042>
- Brosnahan, M.M., Damiani, A., van de Walle, G., Erb, H., Perkins, G.A., Osterrieder, N., 2010. The effect of siRNA treatment on experimental equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in horses. *Virus Research* 147, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.10.017>
- Browning, G.F., Ficorilli, N., Studdert, M.J., 1988. Asinine herpesvirus genomes: comparison with those of the equine herpesviruses. *Archives of Virology* 101, 183–190. <https://doi.org/10.1007/BF01310999>
- Burrel, S., Aime, C., Hermet, L., Ait-Arkoub, Z., Agut, H., Boutolleau, D., 2013. Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: A 4-year survey. *Antiviral Research* 100, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.012>
- Burrel, S., Deback, C., Agut, H., Boutolleau, D., 2010. Genotypic Characterization of UL23 Thymidine Kinase and UL30 DNA Polymerase of Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus: Natural Polymorphism and Mutations Associated with Resistance to Antivirals. *AAC* 54, 4833–4842. <https://doi.org/10.1128/AAC.00669-10>
- Carleton H. M., 1925. Growth, phagocytosis, and other phenomena in tissue cultures of foetal and adult lung. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 213, 365–395. <https://doi.org/10.1098/rstb.1925.0007>
- Carmichael, R.J., Whitfield, C., Maxwell, L.K., 2013. Pharmacokinetics of ganciclovir and valganciclovir in the adult horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 36, 441–449. <https://doi.org/10.1111/jvp.12029>

- Carvalho, R., Oliveira, A.M., Souza, A.M., Passos, L.M., Martins, A.S., 2000. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 145, 1773–1787. <https://doi.org/10.1007/s007050070055>
- Castelo-Soccio, L., 2010. Successful Treatment of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus With Intralesional Cidofovir. *Arch Dermatol* 146, 124. <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2009.363>
- Caughman, G.B., Staczek, J., O’Callaghan, D.J., 1985. Equine herpesvirus type 1 infected cell polypeptides: Evidence for immediate early/early/late regulation of viral gene expression. *Virology* 145, 49–61. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90200-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90200-4)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012. FDA approval of an extended period for administering VariZIG for postexposure prophylaxis of varicella. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 61, 212.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1984. Varicella-zoster immune globulin for the prevention of chickenpox. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee, Centers for Disease Control. *Ann. Intern. Med.* 100, 859–865. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-100-6-859>
- Chang, T.-T., Chao, Y.-C., Cross, A., Apelian, D., 2006. A Comparison of Entecavir and Lamivudine for HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B. *The New England Journal of Medicine* 354, 1001–1010.
- Charretier, C., Saulnier, A., Benair, L., Armanet, C., Bassard, I., Daulon, S., Bernigaud, B., Rodrigues de Sousa, E., Gonthier, C., Zorn, E., Vetter, E., Saintpierre, C., Riou, P., Gaillac, D., 2018. Robust real-time cell analysis method for determining viral infectious titers during development of a viral vaccine production process. *Journal of Virological Methods* 252, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.11.002>
- Chatis, P.A., Miller, C.H., Schragger, L.E., Crumpacker, C.S., 1989. Successful Treatment with Foscarnet of an Acyclovir-Resistant Mucocutaneous Infection with Herpes Simplex Virus in a Patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *New England Journal of Medicine* 320, 297–300. <https://doi.org/10.1056/NEJM198902023200507>
- Chemaly, R.F., Hill, J.A., Voigt, S., Peggs, K.S., 2019. In vitro comparison of currently available and investigational antiviral agents against pathogenic human double-stranded DNA viruses: A systematic literature review. *Antiviral Research* 163, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.008>
- Chesters, P.M., Allsop, R., Purewal, A., Edington, N., 1997. Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *Journal of virology* 71, 3437–3443. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.5.3437-3443.1997>
- Chono, K., Katsumata, K., Kontani, T., Kobayashi, M., Sudo, K., Yokota, T., Konno, K., Shimizu, Y., Suzuki, H., 2010. ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella-zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 1733–1741. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq198>
- Chono, K., Katsumata, K., Kontani, T., Shiraki, K., Suzuki, H., 2012. Characterization of virus strains resistant to the herpes virus helicase–primase inhibitor ASP2151 (Amenamivir). *Biochemical Pharmacology* 84, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.05.020>
- Chou, S., Marousek, G.I., 2006. Maribavir Antagonizes the Antiviral Action of Ganciclovir on Human Cytomegalovirus. *AAC* 50, 3470–3472. <https://doi.org/10.1128/AAC.00577-06>
- Chrisp, P., Clissold, S.P., 1991. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with

- cytomegalovirus retinitis. *Drugs* 41, 104–129. <https://doi.org/10.2165/00003495-199141010-00009>
- Cihlar, T., Ho, E.S., Lin, D.C., Mulato, A.S., 2001. HUMAN RENAL ORGANIC ANION TRANSPORTER 1 (hOAT1) AND ITS ROLE IN THE NEPHROTOXICITY OF ANTIVIRAL NUCLEOTIDE ANALOGS. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 20, 641–648. <https://doi.org/10.1081/NCN-100002341>
- Cihlar, T., Lin, D.C., Pritchard, J.B., Fuller, M.D., Mendel, D.B., Sweet, D.H., 1999. The Antiviral Nucleotide Analogs Cidofovir and Adefovir Are Novel Substrates for Human and Rat Renal Organic Anion Transporter 1. *Mol Pharmacol* 56, 570–580. <https://doi.org/10.1124/mol.56.3.570>
- Clercq, E.D., 1997. In Search of a Selective Antiviral Chemotherapy. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 674–693.
- Clouser, C.L., Patterson, S.E., Mansky, L.M., 2010. Exploiting Drug Repositioning for Discovery of a Novel HIV Combination Therapy. *Journal of Virology* 84, 9301–9309. <https://doi.org/10.1128/JVI.01006-10>
- Cohen, S.G., Greenberg, M.S., 1985. Chronic oral herpes simplex virus infection in immunocompromised patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 59, 465–471. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(85\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0030-4220(85)90085-4)
- Cohen, S.S., 1966. Introduction to the Biochemistry of D-Arabinosyl Nucleosides, in: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 1–88. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60231-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60231-7)
- Crabb, B.S., MacPherson, C.M., Reubel, G.H., Browning, G.F., Studdert, M.J., Drummer, H.E., 1995. A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Archives of Virology* 140, 245–258. <https://doi.org/10.1007/BF01309860>
- Crumpacker, C.S., 1992. Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *The American Journal of Medicine* 92, S3–S7. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(92\)90329-A](https://doi.org/10.1016/0002-9343(92)90329-A)
- Csellner, H., Walker, C., Wellington, J.E., McLure, L.E., Love, D.N., Whalley, J.M., 2000. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch. Virol.* 145, 2371–2385. <https://doi.org/10.1007/s007050070027>
- Curran, M., Noble, S., 2001. Valganciclovir. *Drugs* 61, 1145–1150 ; discussion 1151–1152. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161080-00013>
- Czock, D., Scholle, C., Rasche, F.M., Schaarschmidt, D., Keller, F., 2002. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir in renal impairment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 72, 142–150. <https://doi.org/10.1067/mcp.2002.126306>
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology* 154, 171–177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>
- Dayaram, A., Franz, M., Schattschneider, A., Damiani, A.M., Bischofberger, S., Osterrieder, N., Greenwood, A.D., 2017. Long term stability and infectivity of herpesviruses in water. *Scientific Reports* 7, 46559. <https://doi.org/10.1038/srep46559>
- De Clercq, E., 2013. Antivirals: Past, present and future. *Biochemical Pharmacology* 85, 727–744. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.011>
- De Clercq, E., 2009. Antiviral drug discovery: ten more compounds, and ten more stories (part B). *Med Res Rev* 29, 571–610. <https://doi.org/10.1002/med.20149>

- De Clercq, E., 2008. The discovery of antiviral agents: Ten different compounds, ten different stories. *Medicinal Research Reviews* 28, 929–953. <https://doi.org/10.1002/med.20128>
- De Clercq, E., 2004. Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster. *Biochemical Pharmacology* 68, 2301–2315. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.07.039>
- De Clercq, E., 2002. STRATEGIES IN THE DESIGN OF ANTIVIRAL DRUGS. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 13–25. <https://doi.org/10.1038/nrd703>
- De Clercq, E., 1984. The antiviral spectrum of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 14, 85–95.
- De Clercq, E., Field, H.J., 2006. Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British Journal of Pharmacology* 147, 1–11. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706446>
- De Clercq, E., Holý, A., 2005. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4, 928–940. <https://doi.org/10.1038/nrd1877>
- De Clercq, E., Holý, A., Rosenberg, I., Sakuma, T., Balzarini, J., Maudgal, P.C., 1986. A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature* 323, 464–467. <https://doi.org/10.1038/323464a0>
- De Clercq, E., Li, G., 2016. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clinical Microbiology Reviews* 29, 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>
- de la Fuente, R., Awan, A.R., Field, H.J., 1992. The acyclic nucleoside analogue penciclovir is a potent inhibitor of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in tissue culture and in a murine model. *Antiviral Research* 18, 77–89. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(92\)90007-R](https://doi.org/10.1016/0166-3542(92)90007-R)
- de Miranda, P., Blum, M.R., 1983. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 12, 29–37. https://doi.org/10.1093/jac/12.suppl_B.29
- de Rudder, J., Privat de Garilhe, M., 1965. Inhibitory effect of some nucleosides on the growth of various human viruses in tissue culture. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 5, 578–584.
- Dehghanpir, S.D., Birkenheuer, C.H., Yang, K., Murelli, R.P., Morrison, L.A., Le Grice, S.F.J., Baines, J.D., 2018. Broad anti-herpesviral activity of α -hydroxytropolones. *Veterinary Microbiology* 214, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.016>
- Denesvre, C., 2013. Marek's disease virus morphogenesis. *Avian Dis.* 57, 340–350. <https://doi.org/10.1637/10375-091612-Review.1>
- Deshmane, S.L., Fraser, N.W., 1989. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *Journal of Virology* 63, 943–947. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.2.943-947.1989>
- Diallo, I.S., Hewitson, G., Wright, L., Rodwell, B.J., Corney, B.G., 2006. Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 131, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.010>
- Dimock, W.W., 1940. The diagnosis of virus abortion in mares. *J Am Vet Med Assoc* 96, 665–666.
- Dimock, W.W., Edwards, P.R., 1933. Is there a filterable virus of abortion in mares.
- Dimock, W.W., Edwards, P.R., 1932. Infections of fetuses and foals.
- Doll, E.R., Bryans, J.T., Mccollum, W.H., Crowe, E.W., 1956. Propagation of equine abortion virus in Syrian hamsters. *Cornell Vet* 46, 68–82.
- Donovan, T.A., Schrenzel, M.D., Tucker, T., Pessier, A.P., Bicknese, B., Busch, M.D.M., Wise, A.G., Maes, R., Kiupel, M., McKnight, C., Nordhausen, R.W., 2009a.

- Meningoencephalitis in a Polar Bear Caused by Equine Herpesvirus 9 (EHV-9). *Vet Pathol* 46, 1138–1143. <https://doi.org/10.1354/vp.09-VP-0007-D-CR>
- Donovan, T.A., Schrenzel, M.D., Tucker, T., Pessier, A.P., Bicknese, B., Busch, M.D.M., Wise, A.G., Maes, R., Kiupel, M., McKnight, C., Nordhausen, R.W., 2009b. Meningoencephalitis in a Polar Bear Caused by Equine Herpesvirus 9 (EHV-9). *Vet Pathol* 46, 1138–1143. <https://doi.org/10.1354/vp.09-VP-0007-D-CR>
- Drew, W., 2006. Is combination antiviral therapy for CMV superior to monotherapy? *Journal of Clinical Virology* 35, 485–488. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.09.021>
- Dropulic, L.K., Cohen, J.I., 2010. Update on New Antivirals Under Development for the Treatment of Double-Stranded DNA Virus Infections. *Clin Pharmacol Ther* 88, 610–619. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.178>
- Dunowska, M., Gopakumar, G., Perrott, M.R., Kendall, A.T., Waropastrakul, S., Hartley, C.A., Carslake, H.B., 2015. Virological and serological investigation of Equid herpesvirus 1 infection in New Zealand. *Veterinary Microbiology* 176, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.016>
- Edington, N., Bridges, C.G., Huckle, A., 1985. Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. *Equine Veterinary Journal* 17, 369–372. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1985.tb02524.x>
- Edington, N., Bridges, C.G., Patel, J.R., 1986. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: Equine stroke. *Archives of Virology* 90, 111–124. <https://doi.org/10.1007/BF01314149>
- Edington, N., Smyth, B., Griffiths, L., 1991. The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) Abortions. *Journal of Comparative Pathology* 104, 379–387. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80148-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80148-X)
- Edington, N., Welch, H.M., Griffiths, L., 1994. The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Vet. J.* 26, 140–142. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04353.x>
- Eid, A.J., Arthurs, S.K., Deziel, P.J., Wilhelm, M.P., Razonable, R.R., 2007. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes: Valganciclovir and drug-resistant CMV. *Clinical Transplantation* 22, 162–170. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2007.00761.x>
- El-Habashi, N., El-Nahass, E., Fukushi, H., Nayel, M., Hibi, D., Sakai, H., Yanai, T., 2011a. Effects of equine herpesvirus-9 infection in pregnant mice and hamsters. *J. Comp. Pathol.* 144, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.07.002>
- El-Habashi, N., El-Nahass, E.-S., Abd-Ellatieff, H., Saleh, A., Abas, O., Tsuchiya, Y., Fukushi, H., Yanai, T., 2019. Lesions and Distribution of Viral Antigen in the Brain of Hamsters Infected With Equine Herpesvirus (EHV)-9, EHV-1 Strain Ab4p, and Zebra-Borne EHV-1. *Vet. Pathol.* 56, 691–702. <https://doi.org/10.1177/0300985818825129>
- El-Habashi, N., El-Nahass, E.-S., Fukushi, H., Hibi, D., Sakai, H., Sasseville, V., Yanai, T., 2010. Experimental intranasal infection of equine herpesvirus 9 (EHV-9) in suckling hamsters: kinetics of viral transmission and inflammation in the nasal cavity and brain. *J. Neurovirol.* 16, 242–248. <https://doi.org/10.3109/13550284.2010.489596>
- El-Habashi, N., Murakami, M., El-Nahass, E., Hibi, D., Sakai, H., Fukushi, H., Sasseville, V., Yanai, T., 2011b. Study on the infectivity of equine herpesvirus 9 (EHV-9) by different routes of inoculation in hamsters. *Vet. Pathol.* 48, 558–564. <https://doi.org/10.1177/0300985810375053>

- Elion, G.B., Furman, P.A., Fyfe, J.A., de Miranda, P., Beauchamp, L., Schaeffer, H.J., 1977. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5716–5720. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5716>
- Elliott, G., O'Hare, P., 1995. Equine herpesvirus 1 gene 12, the functional homologue of herpes simplex virus VP16, transactivates via octamer sequences in the equine herpesvirus 1E gene promoter. *Virology* 213, 258–262. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1568>
- El-Nahass, E., El-Habashi, N., Nayel, M., Kasem, S., Fukushi, H., Suzuki, Y., Hirata, A., Sakai, H., Yanai, T., 2011. Kinetics and pathogenicity of equine herpesvirus-9 infection following intraperitoneal inoculation in hamsters. *J. Comp. Pathol.* 145, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.009>
- Fang, Y., Ye, P., Wang, X., Xu, X., Reisen, W., 2011. Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *Journal of Virological Methods* 173, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.013>
- Ferreira, C.G.T., Campos, M.G., Felix, D.M., Santos, M.R., Carvalho, O.V. de, Diaz, M.A.N., Fietto, J.L.R., Bressan, G.C., Silva-Júnior, A., Almeida, M.R. de, 2018. Evaluation of the antiviral activities of *Bacharis dracunculifolia* and quercetin on Equid herpesvirus 1 in a murine model. *Research in Veterinary Science* 120, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.09.001>
- Field, H., Clercq, E., 2004. Antiviral drugs—a short history of their discovery and development. *Microbiol Today* 31, 58–61.
- Field, H.J., Awan, A.R., 1990. Effective chemotherapy of equine herpesvirus 1 by phosphonylmethoxyalkyl derivatives of adenine demonstrated in a novel murine model for the disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 709–717. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.5.709>
- Fisher, C.E., Knudsen, J.L., Lease, E.D., Jerome, K.R., Rakita, R.M., Boeckh, M., Limaye, A.P., 2017. Risk Factors and Outcomes of Ganciclovir Resistant Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases* 65, 57–63.
- Florescu, D.F., Keck, M.A., 2014. Development of CMX001 (Brincidofovir) for the treatment of serious diseases or conditions caused by dsDNA viruses. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 12, 1171–1178. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.948847>
- Foote, A.K., Ricketts, S.W., Whitwell, K.E., 2012. A racing start in life? The hurdles of equine fetoplacental pathology: Perinatal pathology. *Equine Veterinary Journal* 44, 120–129. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00507.x>
- Forbes, B., Ehrhardt, C., 2005. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60, 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.02.010>
- Fougerolle S., Fortier C., Legrand L., Jourdan M., Marcillaud-Pitel C., Pronost S., Paillot R., 2019. 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* 7, 174. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040174>
- Frampton, A.R., Goins, W.F., Cohen, J.B., von Einem, J., Osterrieder, N., O'Callaghan, D.J., Glorioso, J.C., 2005. Equine Herpesvirus 1 Utilizes a Novel Herpesvirus Entry Receptor. *JVI* 79, 3169–3173. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.3169-3173.2005>
- Frampton, A.R., Stolz, D.B., Uchida, H., Goins, W.F., Cohen, J.B., Glorioso, J.C., 2007. Equine Herpesvirus 1 Enters Cells by Two Different Pathways, and Infection Requires the

- Activation of the Cellular Kinase ROCK1. *Journal of Virology* 81, 10879–10889. <https://doi.org/10.1128/JVI.00504-07>
- Frampton, A.R., Uchida, H., von Einem, J., Goins, W.F., Grandi, P., Cohen, J.B., Osterrieder, N., Glorioso, J.C., 2010. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) utilizes microtubules, dynein, and ROCK1 to productively infect cells. *Veterinary Microbiology* 141, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.035>
- Friday, P.A., Scarratt, W.K., Elvinger, F., Timoney, P.J., Bonda, A., 2000. Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 197–201.
- Frobert, E., Burrel, S., Ducastelle-Lepretre, S., Billaud, G., Ader, F., Casalegno, J.-S., Nave, V., Boutolleau, D., Michallet, M., Lina, B., Morfin, F., 2014. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: An update from a ten-year survey in France. *Antiviral Research* 111, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.08.013>
- Fukushi, H., Taniguchi, A., Yasuda, K., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T., Hirai, K., 2000. A hamster model of equine herpesvirus 9 induced encephalitis. *J. Neurovirol.* 6, 314–319. <https://doi.org/10.3109/13550280009030757>
- Fukushi, H., Tomita, T., Taniguchi, A., Ochiai, Y., Kirisawa, R., Matsumura, T., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T., Hirai, K., 1997. Gazelle Herpesvirus 1: A New Neurotropic Herpesvirus Immunologically Related to Equine Herpesvirus 1. *Virology* 227, 34–44. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8296>
- Fulton, A., Peters, S.T., Perkins, G.A., Jarosinski, K.W., Damiani, A., Brosnahan, M., Buckles, E.L., Osterrieder, N., Van de Walle, G.R., 2009. Effective Treatment of Respiratory Alphaherpesvirus Infection Using RNA Interference. *PLoS ONE* 4, e4118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004118>
- Fyfe, J.A., 1982. Differential phosphorylation of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine monophosphate by thymidylate kinases from herpes simplex viruses types 1 and 2 and varicella zoster virus. *Mol. Pharmacol.* 21, 432–437.
- Garber D. A., Beverley S. M., Coen D. M., 1993. Demonstration of Circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197, 459–462.
- Gardella, C., Brown, Z.A., 2007. Managing varicella zoster infection in pregnancy. *Cleve Clin J Med* 74, 290–296. <https://doi.org/10.3949/ccjm.74.4.290>
- Garré, B., Gryspeerdt, A., Croubels, S., De Backer, P., Nauwynck, H., 2009. Evaluation of orally administered valacyclovir in experimentally EHV1-infected ponies. *Veterinary Microbiology* 135, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.062>
- Garré, Barbara, Shebany, K., Gryspeerdt, A., Baert, K., van der Meulen, K., Nauwynck, H., Deprez, P., De Backer, P., Croubels, S., 2007. Pharmacokinetics of Acyclovir after Intravenous Infusion of Acyclovir and after Oral Administration of Acyclovir and Its Prodrug Valacyclovir in Healthy Adult Horses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 4308–4314. <https://doi.org/10.1128/AAC.00116-07>
- Garré, B., Vandermeulen, K., Nugent, J., Neyts, J., Croubels, S., Debacker, P., Nauwynck, H., 2007. In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. *Veterinary Microbiology* 122, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.004>
- Garrett, D., Montesso, F., Fougereolle, S., Lopez-Alvarez, M.R., Birand, I., De Bock, M., Huang, C.M., Legrand, L., Pronost, S., Paillot, R., 2017. Refinement of the equine influenza model in the natural host: A meta-analysis to determine the benefits of individual

- nebulisation for experimental infection and vaccine evaluation in the face of decreased strain pathogenicity. *Veterinary Microbiology* 211, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.10.010>
- Garvey, M., Suárez, N.M., Kerr, K., Hector, R., Moloney-Quinn, L., Arkins, S., Davison, A.J., Cullinane, A., 2018. Equid herpesvirus 8: Complete genome sequence and association with abortion in mares. *PLoS ONE* 13, e0192301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192301>
- Gaudreau, A., Hill, E., Balfour, H.H., Erice, A., Boivin, G., 1998. Phenotypic and Genotypic Characterization of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Viruses from Immunocompromised Patients. *Journal of Infectious Diseases* 178, 297–303. <https://doi.org/10.1086/515626>
- Gershon A. A., Steinberg S., Brunell P. A., 1974. Zoster immune globulin. *The New England Journal of Medicine* 290, 243–245.
- Gerst, S., Borchers, K., Gower, S.M., Smith, K.C., 2003. Detection of EHV-1 and EHV-4 in placental sections of naturally occurring EHV-1- and EHV-4-related abortions in the UK: use of the placenta in diagnosis. *Equine Veterinary Journal* 35, 430–433. <https://doi.org/10.2746/042516403775600451>
- Gibson, J.S., 1992. The activity of (S)-l-[(3-hydroxy-2-phosphonyl methoxy) propyl] cytosine (HPMPC) against equine herpesvirus- 1 (EHV- 1) in cell cultures, mice and horses. *Antiviral Research* 19, 219–232.
- Gibson, J.S., Slater, J.D., Awan, A.R., Field, H.J., 1992. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Archives of Virology* 123, 351–366. <https://doi.org/10.1007/BF01317269>
- Gill, K.S., Wood, M.J., 1996. The Clinical Pharmacokinetics of Famciclovir: Clinical Pharmacokinetics 31, 1–8. <https://doi.org/10.2165/00003088-199631010-00001>
- Gilliam, S.E., Field, H.J., 1993. The effect of (S)-l-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)cytosine (HPMPC) on bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infection and reactivation in cattle. *Antiviral Res.* 20, 21–32. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(93\)90056-o](https://doi.org/10.1016/0166-3542(93)90056-o)
- Glorieux, S., Bachert, C., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, A.P., Steukers, L., Rekecki, A., Van den Broeck, W., Goossens, J., Croubels, S., Clayton, R.F., Nauwynck, H.J., 2011a. Herpes Simplex Virus Type 1 Penetrates the Basement Membrane in Human Nasal Respiratory Mucosa. *PLoS ONE* 6, e22160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022160>
- Glorieux, S., Favoreel, H.W., Steukers, L., Vandekerckhove, A.P., Nauwynck, H.J., 2011b. A trypsin-like serine protease is involved in pseudorabies virus invasion through the basement membrane barrier of porcine nasal respiratory mucosa. *Vet Res* 42, 58. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-58>
- Glorieux, S., Van den Broeck, W., van der Meulen, K.M., Van Reeth, K., Favoreel, H.W., Nauwynck, H.J., 2007. In vitro culture of porcine respiratory nasal mucosa explants for studying the interaction of porcine viruses with the respiratory tract. *Journal of Virological Methods* 142, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.01.018>
- Glorieux, S., Vandekerckhove, A.P., Goris, N., Yang, X.-Y., Steukers, L., Van de Walle, G.R., Croubels, S., Neyts, J., Nauwynck, H.J., 2012. Evaluation of the antiviral activity of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-yl]methyl]guanine (A-5021) against equine herpesvirus type 1 in cell monolayers and equine nasal mucosal explants. *Antiviral Research* 93, 234–238. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.11.016>

- Goehring, L.S., Brandes, K., Ashton, L.V., Wittenburg, L.A., Olea-Popelka, F.J., Lunn, D.P., Soboll Hussey, G., 2017. Anti-inflammatory drugs decrease infection of brain endothelial cells with EHV-1 in vitro. *Equine Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1111/evj.12656>
- Goehring, L.S., Hussey, G.S., Ashton, L.V., Schenkel, A.R., Lunn, D.P., 2011. Infection of central nervous system endothelial cells by cell-associated EHV-1. *Veterinary Microbiology* 148, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.030>
- Goehring, L.S., Landolt, G.A., Morley, P.S., 2010. Detection and Management of an Outbreak of Equine Herpesvirus Type 1 Infection and Associated Neurological Disease in a Veterinary Teaching Hospital: EHV-1 Outbreak at CSU. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 1176–1183. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0558.x>
- Goehring, Lutz S., van Maanen, C., Berendsen, M., Cullinane, A., de Groot, R.J., Rottier, P.J.M., Wesselingh, J.J.C.M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., 2010. Experimental infection with neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) in adult horses. *The Veterinary Journal* 186, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.08.007>
- Goehring, L.S., Winden, S.C., Maanen, C. van, Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S., 2006. Equine Herpesvirus Type 1-Associated Myeloencephalopathy in The Netherlands: A Four-Year Retrospective Study (1999–2003). *Journal of veterinary internal medicine* 20, 601–607.
- Goldner, T., Hempel, C., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., Lischka, P., 2014. Genotypic and Phenotypic Characterization of Human Cytomegalovirus Mutants Selected In Vitro after Letemovir (AIC246) Exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 610–613. <https://doi.org/10.1128/AAC.01794-13>
- Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., Lischka, P., 2011. The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letemovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral Mechanism That Involves the Viral Terminase. *Journal of Virology* 85, 10884–10893. <https://doi.org/10.1128/JVI.05265-11>
- Golke, A., Cymerys, J., Słowska, A., Dzieciatkowski, T., Chmielewska, A., Tucholska, A., Bańbura, M., 2012. The xCELLigence system for real-time and label-free analysis of neuronal and dermal cell response to Equine Herpesvirus type 1 infection. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 15. <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0126-4>
- Goodman, L., Wagner, B., Flaminio, M., Sussman, K., Metzger, S., Holland, R., Osterrieder, N., 2006. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Vaccine* 24, 3636–3645. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.01.062>
- Goodman, L.B., Loregian, A., Perkins, G.A., Nugent, J., Buckles, E.L., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palù, G., Smith, K.C., Osterrieder, N., Davis-Poynter, N., 2007. A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase Determines Neuropathogenicity. *PLoS Pathog* 3, e160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030160>
- Goodwin, L., 1989. George Hitchings and Gertrude Elion--nobel prizewinners. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 5, 33. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90184-1](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90184-1)
- Grainger, C.I., Greenwell, L.L., Lockley, D.J., Martin, G.P., Forbes, B., 2006. Culture of Calu-3 Cells at the Air Interface Provides a Representative Model of the Airway Epithelial Barrier. *Pharm Res* 23, 1482–1490. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0255-0>
- Granzow, H., Klupp, B.G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N., Mettenleiter, T.C., 2001. Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. *Journal of Virology* 75, 3675–3684. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3675-3684.2001>

- Gravina, H.D., Tafuri, N.F., Silva Júnior, A., Fietto, J.L.R., Oliveira, T.T., Diaz, M.A.N., Almeida, M.R., 2011. In vitro assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1. *Research in Veterinary Science* 91, e158–e162. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.11.010>
- Gray, W.L., Baumann, R.P., Robertson, A.T., Caughman, G.B., O’Callaghan, D.J., Staczek, J., 1987a. Regulation of equine herpesvirus type 1 gene expression: Characterization of immediate early, early, and late transcription. *Virology* 158, 79–87. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90240-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90240-6)
- Gray, W.L., Baumann, R.P., Robertson, A.T., O’Callaghan, D.J., Staczek, J., 1987b. Characterization and mapping of equine herpesvirus type 1 immediate early, early, and late transcripts. *Virus Research* 8, 233–244. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(87\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0168-1702(87)90018-9)
- Greenwood, A.D., Tsangaras, K., Ho, S.Y.W., Szentiks, C.A., Nikolin, V.M., Ma, G., Damiani, A., East, M.L., Lawrenz, A., Hofer, H., Osterrieder, N., 2012. A Potentially Fatal Mix of Herpes in Zoos. *Current Biology* 22, 1727–1731. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.035>
- Greggs, W.M., Clouser, C.L., Patterson, S.E., Mansky, L.M., 2012. Discovery of drugs that possess activity against feline leukemia virus. *Journal of General Virology* 93, 900–905. <https://doi.org/10.1099/vir.0.039909-0>
- Gryspeerd, A.C., Vandekerckhove, A.P., Baghi, H.B., Van de Walle, G.R., Nauwynck, H.J., 2012. Expression of late viral proteins is restricted in nasal mucosal leucocytes but not in epithelial cells during early-stage equine herpes virus-1 infection. *The Veterinary Journal* 193, 576–578. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.01.022>
- Gryspeerd, A.C., Vandekerckhove, A.P., Garré, B., Barbé, F., Van de Walle, G.R., Nauwynck, H.J., 2010. Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses. *Veterinary Microbiology* 142, 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.015>
- Gueudry, J., Boutolleau, D., Gueudin, M., Burrel, S., Miri, A., Bodaghi, B., Muraine, M., 2013. Acyclovir-resistant varicella-zoster virus keratitis in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Virology* 58, 318–320. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.04.024>
- Guevara, L., Abdelgawad, A., Onzere, C., Greenwood, A.D., Davidson, Z., Bishop, R., Mutinda, M., 2018. Seroprevalence of Equine Herpesviruses 1 and 9 (EHV-1 and EHV-9) in Wild Grévy’s Zebra (*Equus grevyi*) in Kenya. *J. Wildl. Dis.* 54, 848–851. <https://doi.org/10.7589/2018-01-003>
- Guo, H., Shen, S., Wang, L., Deng, H., 2010. Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell* 1, 987–998. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0120-0>
- Hamirally, S., Kamil, J.P., Ndassa-Colday, Y.M., Lin, A.J., Jahng, W.J., Baek, M.-C., Noton, S., Silva, L.A., Simpson-Holley, M., Knipe, D.M., Golan, D.E., Marto, J.A., Coen, D.M., 2009. Viral Mimicry of Cdc2/Cyclin-Dependent Kinase 1 Mediates Disruption of Nuclear Lamina during Human Cytomegalovirus Nuclear Egress. *PLoS Pathog* 5, e1000275. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000275>
- Harrison, R.G., 1959. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp. Zool.* 142, 5–73. <https://doi.org/10.1002/jez.1401420103>
- Hartley, C.A., Wilks, C.R., Studdert, M.J., Gilkerson, J.R., 2005. Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. *Am. J. Vet. Res.* 66, 921–928. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.921>

- Hasebe, R., Sasaki, M., Sawa, H., Wada, R., Umemura, T., Kimura, T., 2009. Infectious entry of equine herpesvirus-1 into host cells through different endocytic pathways. *Virology* 393, 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.032>
- Heidelberger, C., Parsons, D.G., Remy, D.C., 1964. SYNTHESIS OF 5-TRIFLUOROMETHYLURACIL AND 5-TRIFLUOROMETHYL-2'-DEOXYURIDINE. *J. Med. Chem.* 7, 1–5. <https://doi.org/10.1021/jm00331a001>
- Heldens, J.G.M., Hannant, D., Cullinane, A.A., Prendergast, M.J., Mumford, J.A., Nelly, M., Kydd, J.H., Weststrate, M.W., van den Hoven, R., 2001. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine* 19, 4307–4317. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00131-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00131-1)
- Helgstrand, E., Eriksson, B., Johansson, N.G., Lannero, B., Larsson, A., Misiorny, A., Noren, J.O., Sjoberg, B., Stenberg, K., Stening, G., Stridh, S., Oberg, B., 1978. Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science* 201, 819–821. <https://doi.org/10.1126/science.210500>
- Henninger, R.W., Reed, S.M., Saville, W.J., Allen, G.P., Hass, G.F., Kohn, C.W., Sofaly, C., 2007. Outbreak of Neurologic Disease Caused by Equine Herpesvirus-1 at a University Equestrian Center. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 157–165.
- Herrmann, E.C., 1961. Plaque Inhibition Test for Detection of Specific Inhibitors of DNA Containing Viruses. *Experimental Biology and Medicine* 107, 142–145. <https://doi.org/10.3181/00379727-107-26560>
- Hill, H., Maré, C.J., 1974. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 35, 669–672.
- Ho, E.S., Lin, D.C., Mendel, D.B., Cihlar, T., 2000. Cytotoxicity of Antiviral Nucleotides Adefovir and Cidofovir Is Induced by the Expression of Human Renal Organic Anion Transporter. *J Am Soc Nephrol* 11.
- Hostetler, K.Y., 2009. Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: Current state of the art. *Antiviral Research* 82, A84–A98. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.01.005>
- House, J.A., Gregg, D.A., Lubroth, J., Dubovi, E.J., Torres, A., 1991. Experimental Equine Herpesvirus-1 Infection in Llamas (*Lama Glama*). *J VET Diagn Invest* 3, 137–143. <https://doi.org/10.1177/104063879100300206>
- Hussey, G., Goehring, L.S., Lunn, D.P., Hussey, S.B., Huang, T., Osterrieder, N., Powell, C., Hand, J., Holz, C., Slater, J., 2013. Experimental infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces chorioretinal lesions. *Vet Res* 44, 118. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-118>
- Ireland, P.J., Tavis, J.E., D'Erasmus, M.P., Hirsch, D.R., Murelli, R.P., Cadiz, M.M., Patel, B.S., Gupta, A.K., Edwards, T.C., Korom, M., Moran, E.A., Morrison, L.A., 2016. Synthetic α -Hydroxytropolones Inhibit Replication of Wild-Type and Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2140–2149. <https://doi.org/10.1128/AAC.02675-15>
- Itahashi, M., Higaki, S., Sugahara, D., Sugioka, K., Deai, T., Takao, K., Hayashi, K., Shimomura, Y., 2008. A-5021: A New Acyclovir Analogue Inhibits Murine Herpetic Keratitis. *Cornea* 27, 334–338. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31815d889b>
- Iwayama, S., Ohmura, Y., Suzuki, K., Ono, N., Nakazawa, H., Aoki, M., Tanabe, I., Sekiyama, T., Tsuji, T., Okunishi, M., Yamanishi, K., Nishiyama, Y., 1999. Evaluation of anti-herpesvirus activity of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-

- yl]methyl]guanine (A-5021) in mice. *Antiviral Research* 42, 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(99\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(99)00024-8)
- Iwayama, S., Ono, N., Ohmura, Y., Suzuki, K., Aoki, M., Nakazawa, H., Oikawa, M., Kato, T., Okunishi, M., Nishiyama, Y., Yamanishi, K., 1998. Antiherpesvirus Activities of (1JS,2JR)-9-[[1J,2J- Bis(hydroxymethyl)cycloprop-1J-yl]methyl]guanine (A-5021) in Cell Culture. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.* 42, 5.
- Jackson, T., Kendrick, J.W., 1971. Paralysis of horses associated with equine herpesvirus 1 infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 158, 1351–1357.
- James, S., Larson, K., Acosta, E., Prichard, M., 2015. Helicase-Primase as a Target of New Therapies for Herpes Simplex Virus Infections. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 97, 66–78. <https://doi.org/10.1002/cpt.3>
- James, S.H., Hartline, C.B., Harden, E.A., Driebe, E.M., Schupp, J.M., Engelthaler, D.M., Keim, P.S., Bowlin, T.L., Kern, E.R., Prichard, M.N., 2011. Cyclopropavir Inhibits the Normal Function of the Human Cytomegalovirus UL97 Kinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4682–4691. <https://doi.org/10.1128/AAC.00571-11>
- Jourdan, J., Bureau, R., Rochais, C., Dallemagne, P., 2020. Drug repositioning: a brief overview. *J Pharm Pharmacol jphp.13273*. <https://doi.org/10.1111/jphp.13273>
- Jung, D., Dorr, A., 1999. Single-dose pharmacokinetics of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive subjects. *J Clin Pharmacol* 39, 800–804. <https://doi.org/10.1177/00912709922008452>
- Kakiuchi, S., Nonoyama, S., Wakamatsu, H., Kogawa, K., Wang, L., Kinoshita-Yamaguchi, H., Takayama-Ito, M., Lim, C.-K., Inoue, N., Mizuguchi, M., Igarashi, T., Saijo, M., 2013. Neonatal Herpes Encephalitis Caused by a Virologically Confirmed Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus 1 Strain. *J. Clin. Microbiol.* 51, 356–359. <https://doi.org/10.1128/JCM.02247-12>
- Kamel, M., Pavulraj, S., Osterrieder, K., Azab, W., 2019. EHV-1 Pathogenesis: Current in vitro Models and Future Perspectives. *Front. Vet. Sci.* 6, 251. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00251>
- Kanitz, F.A., Cargnelutti, J.F., Anziliero, D., Gonçalves, K.V., Masuda, E.K., Weiblen, R., Flores, E.F., 2015. Respiratory and neurological disease in rabbits experimentally infected with equid herpesvirus 1. *Microb. Pathog.* 87, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.07.007>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., Lamperska, K., 2016. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *aoms* 14, 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Karlin, S., Mocarski, E.S., Schachtel, G.A., 1994. Molecular evolution of herpesviruses: genomic and protein sequence comparisons. *Journal of Virology* 68, 1886–1902. <https://doi.org/10.1128/JVI.68.3.1886-1902.1994>
- Kasem, S., Yamada, S., Kiupel, M., Woodruff, M., Ohya, K., Fukushi, H., 2008. Equine Herpesvirus Type 9 in Giraffe with Encephalitis. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1948–1949.
- Katz, D.H., Marcelletti, J.F., Khalil, M.H., Pope, L.E., Katz, L.R., 1991. Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 10825–10829.

- Kaufman, H., Martola, E.L., Dohlman, C., 1962. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis. *Arch. Ophthalmol.* 68, 235–239. <https://doi.org/10.1001/archophth.1962.00960030239015>
- Kaufman, H.E., 1962. Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2-deoxyuridine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109, 251–252. <https://doi.org/10.3181/00379727-109-27169>
- Kaufman, H.E., Heidelberger, C., 1964. THERAPEUTIC ANTIVIRAL ACTION OF 5-TRIFLUOROMETHYL-2'-DEOXYURIDINE IN HERPES SIMPLEX KERATITIS. *Science* 145, 585–586. <https://doi.org/10.1126/science.145.3632.585>
- Kaul, D.R., Stoelben, S., Cober, E., Ojo, T., Sandusky, E., Lischka, P., Zimmermann, H., Rubsamen-Schaeff, H., 2011. First Report of Successful Treatment of Multidrug-Resistant Cytomegalovirus Disease with the Novel Anti-CMV Compound AIC246: AIC246 Multidrug-Resistant CMV Disease. *American Journal of Transplantation* 11, 1079–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03530.x>
- Ke, N., Xi, B., Ye, P., Xu, W., Zheng, M., Mao, L., Wu, M.-J., Zhu, J., Wu, J., Zhang, W., Zhang, J., Irelan, J., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y.A., 2010. Screening and Identification of Small Molecule Compounds Perturbing Mitosis Using Time-Dependent Cellular Response Profiles. *Analytical Chemistry* 82, 6495–6503. <https://doi.org/10.1021/ac1007877>
- Kibenge, F.S., Harris, L.M., McKenna, P.K., Wadowska, D., Yason, C.V., 1994. Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1206–1212.
- Kleymann, G., Fischer, R., Betz, U.A.K., Hendrix, M., Bender, W., Schneider, U., Handke, G., Eckenberg, P., Hewlett, G., Pevzner, V., Baumeister, J., Weber, O., Henninger, K., Keldenich, J., Jensen, A., Kolb, J., Bach, U., Popp, A., Mäben, J., Frappa, I., Haebich, D., Lockhoff, O., Rübsemann-Waigmann, H., 2002. New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat Med* 8, 392–398. <https://doi.org/10.1038/nm0402-392>
- Kohn, C.W., Fenner, W.R., 1987. Equine herpes myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 3, 405–419. [https://doi.org/10.1016/s0749-0739\(17\)30683-1](https://doi.org/10.1016/s0749-0739(17)30683-1)
- Korvasová, Z., Drašar, L., Mašek, J., Turánek Knotigová, P., Kulich, P., Matiašovic, J., Kovařík, K., Bartheldyová, E., Koudelka, Š., Škrabalová, M., Miller, A.D., Holý, A., Ledvina, M., Turánek, J., 2012. Antiviral effect of HPMPC (Cidofovir®), entrapped in cationic liposomes: in vitro study on MDBK cell and BHV-1 virus. *J Control Release* 160, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.040>
- Krosky, P.M., Baek, M.-C., Coen, D.M., 2003. The Human Cytomegalovirus UL97 Protein Kinase, an Antiviral Drug Target, Is Required at the Stage of Nuclear Egress. *JVI* 77, 905–914. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.2.905-914.2003>
- Kurtz, B.M., Singletary, L.B., Kelly, S.D., Frampton, A.R., 2010. Equus caballus Major Histocompatibility Complex Class I Is an Entry Receptor for Equine Herpesvirus Type 1. *JVI* 84, 9027–9034. <https://doi.org/10.1128/JVI.00287-10>
- Kydd, J.H., Hannant, D., Robinson, R.S., Bryant, N., Osterrieder, N., 2020. Vaccination of foals with a modified live, equid herpesvirus-1 gM deletion mutant (RacHΔgM) confers partial protection against infection. *Vaccine* 38, 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.106>
- Kydd, J.H., Townsend, H.G.G., Hannant, D., 2006. The equine immune response to equine herpesvirus-1: The virus and its vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 111, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.005>

- Lacy, S.A., Hitchcock, M.J.M., Lee, W.A., Tellier, P., Cundy, K.C., 1998. Effect of Oral Probenecid Coadministration on the Chronic Toxicity and Pharmacokinetics of Intravenous Cidofovir in Cynomolgus Monkeys. *Toxicological Sciences* 44, 97–106.
- Lahmer, T., Hoffmann, D., Heemann, U., Kühle, C., Frank, H., 2010. Epstein-Barr virus encephalitis after kidney transplantation and successful treatment with brivudine: Letter to the editor. *Transplant International* 23, e24–e25. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.01045.x>
- Lang, A., de Vries, M., Feineis, S., Müller, E., Osterrieder, N., Damiani, A.M., 2013. Development of a peptide ELISA for discrimination between serological responses to equine herpesvirus type 1 and 4. *J. Virol. Methods* 193, 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.044>
- Lanier, R., Trost, L., Tippin, T., Lampert, B., Robertson, A., Foster, S., Rose, M., Painter, W., O'Mahony, R., Almond, M., Painter, G., 2010. Development of CMX001 for the Treatment of Poxvirus Infections. *Viruses* 2, 2740–2762. <https://doi.org/10.3390/v2122740>
- Latief, M.A., Chikama, T., Ko, J.-A., Kiuchi, Y., Sakaguchi, T., 2015. Inactivation of acyclovir-sensitive and -resistant strains of herpes simplex virus type 1 in vitro by photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Molecular Vision* 6.
- Laval, K., Favoreel, H.W., Van Cleemput, J., Poelaert, K.C.K., Brown, I.K., Verhasselt, B., Nauwynck, H.J., 2016. Entry of equid herpesvirus 1 into CD172a+ monocytic cells. *Journal of General Virology* 97, 733–746. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000375>
- Lechmann, J., Schoster, A., Ernstberger, M., Fouché, N., Fraefel, C., Bachofen, C., 2019. A novel PCR protocol for detection and differentiation of neuropathogenic and non-neuropathogenic equid alphaherpesvirus 1. *J VET Diagn Invest* 31, 696–703. <https://doi.org/10.1177/1040638719871975>
- Ledbetter, E.C., 2013. Canine herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. *N Z Vet J* 61, 193–201. <https://doi.org/10.1080/00480169.2013.768151>
- Ledbetter, E.C., Nicklin, A.M., Spertus, C.B., Pennington, M.R., Van de Walle, G.R., Mohammed, H.O., 2018. Evaluation of topical ophthalmic ganciclovir gel for the treatment of dogs with experimentally induced ocular canine herpesvirus-1 infection. *Am. J. Vet. Res.* 79, 762–769. <https://doi.org/10.2460/ajvr.79.7.762>
- Ledbetter, E.C., Spertus, C.B., Pennington, M.R., Van de Walle, G.R., Judd, B.E., Mohammed, H.O., 2015. In Vitro and In Vivo Evaluation of Cidofovir as a Topical Ophthalmic Antiviral for Ocular Canine Herpesvirus-1 Infections in Dogs. *J Ocul Pharmacol Ther* 31, 642–649. <https://doi.org/10.1089/jop.2015.0024>
- Lee, W.W., Benitez, A., Goodman, L., Baker, B.R., 1960. POTENTIAL ANTICANCER AGENTS. ¹ XL. SYNTHESIS OF THE β -ANOMER OF 9-(D-ARABINOFURANOSYL)-ADENINE. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2648–2649. <https://doi.org/10.1021/ja01495a070>
- Léon, A., Fortier, G., Fortier, C., Freymuth, F., Tapprest, J., Leclercq, R., Pronost, S., 2008. Detection of equine herpesviruses in aborted fetuses by consensus PCR. *Veterinary Microbiology* 126, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.019>
- Liang, Y., Vogel, J.L., Narayanan, A., Peng, H., Kristie, T.M., 2009. Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks α -herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nat Med* 15, 1312–1317. <https://doi.org/10.1038/nm.2051>
- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Franssen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., Pauwels, P., 2012. Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and

- Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays. *PLoS ONE* 7, e46536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046536>
- Liu, C., Guo, W., Lu, G., Xiang, W., Wang, X., 2012. Complete Genomic Sequence of an Equine Herpesvirus Type 8 Wh Strain Isolated from China. *Journal of Virology* 86, 5407–5407. <https://doi.org/10.1128/JVI.00445-12>
- Liu, M., Lo, C.-Y., Wang, G., Chow, H.-F., Ngo, J.C.-K., Wan, D.C.-C., Poon, L.L.-M., Shaw, P.-C., 2017. Identification of influenza polymerase inhibitors targeting polymerase PB2 cap-binding domain through virtual screening. *Antiviral Research* 144, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.06.009>
- Long, S.Y., Latimer, E.M., Hayward, G.S., 2016. Review of Elephant Endotheliotropic Herpesviruses and Acute Hemorrhagic Disease. *ILAR J* 56, 283–296. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv041>
- Lunn, D.P., Davis-Poynter, N., Flaminio, M.J.B.F., Horohov, D.W., Osterrieder, K., Pusterla, N., Townsend, H.G.G., 2009. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 450–461. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x>
- Ma, G., Feineis, S., Osterrieder, N., Van de Walle, G.R., 2012. Identification and Characterization of Equine Herpesvirus Type 1 pUL56 and Its Role in Virus-Induced Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I. *Journal of Virology* 86, 3554–3563. <https://doi.org/10.1128/JVI.06994-11>
- Machida, N., Taniguchi, T., Nakamura, T., Kiryu, K., 1997. Cardio-histopathological observations on aborted equine fetuses infected with equid herpesvirus 1 (EHV-1). *Journal of Comparative Pathology* 116, 379–385. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80054-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80054-0)
- Maertens, J., Cordonnier, C., Jaksch, P., Poiré, X., Uknis, M., Wu, J., Wijatyk, A., Saliba, F., Witzke, O., Villano, S., 2019. Maribavir for Preemptive Treatment of Cytomegalovirus Reactivation. *N Engl J Med* 381, 1136–1147. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714656>
- Manninger, R., 1949. Studies on infectious abortions in mares due to a filterable virus. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 62–69.
- Marin, M., Güris, D., Chaves, S.S., Schmid, S., Seward, J.F., Advisory Committee on Immunization Practices, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2007. Prevention of varicella: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 56, 1–40.
- Marlina, S., Shu, M.-H., AbuBakar, S., Zandi, K., 2015. Development of a Real-Time Cell Analysing (RTCA) method as a fast and accurate screen for the selection of chikungunya virus replication inhibitors. *Parasites & Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1104-y>
- Marquez, V.E., Hughes, S.H., Sei, S., Agbaria, R., 2006. The history of N-methanocarbathymidine: The investigation of a conformational concept leads to the discovery of a potent and selective nucleoside antiviral agent. *Antiviral Research* 71, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.04.012>
- Marquez, V.E., Siddiqui, M.A., Ezzitouni, A., Russ, P., Wang, J., Wagner, R.W., Matteucci, M.D., 1996. Nucleosides with a Twist. Can Fixed Forms of Sugar Ring Pucker Influence Biological Activity in Nucleosides and Oligonucleotides? *Journal of Medicinal Chemistry* 39, 3739–3747.

- Marty, F.M., Boeckh, M., 2011. Maribavir and human cytomegalovirus—what happened in the clinical trials and why might the drug have failed? *Current Opinion in Virology* 1, 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.011>
- Marty, F.M., Ljungman, P., Chemaly, R.F., Maertens, J., Dadwal, S.S., Duarte, R.F., Haider, S., Ullmann, A.J., Katayama, Y., Brown, J., Mullane, K.M., Boeckh, M., Blumberg, E.A., Einsele, H., Snyderman, D.R., Kanda, Y., DiNubile, M.J., Teal, V.L., Wan, H., Murata, Y., Kartsonis, N.A., Leavitt, R.Y., Badshah, C., 2017. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 377, 2433–2444. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706640>
- Matsumura, T., Kondo, T., Sugita, S., Damiani, A.M., O’Callaghan, D.J., Imagawa, H., 1998. An Equine Herpesvirus Type 1 Recombinant with a Deletion in the gE and gI Genes Is Avirulent in Young Horses. *Virology* 242, 68–79. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8984>
- Matthews, R.E.F., 1979. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 12, 3–5.
- Maudgal, P.C., Clercq, E.D., 1991. Bromovinyldeoxyuridine treatment of herpetic keratitis clinically resistant to other antiviral agents. *Current Eye Research* 10, 193–199. <https://doi.org/10.3109/02713689109020379>
- Maxwell, L.K., 2017. Antihherpetic Drugs in Equine Medicine. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 33, 99–125. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.12.002>
- Maxwell, L.K., Bentz, B.G., Bourne, D.W.A., Erkert, R.S., 2008. Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31, 312–320. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x>
- Maxwell, L.K., Bentz, B.G., Gilliam, L.L., Ritchey, J.W., Pusterla, N., Eberle, R., Holbrook, T.C., McFarlane, D., Rezabek, G.B., Meinkoth, J., Whitfield, C., Goad, C.L., Allen, G.P., 2017. Efficacy of the early administration of valacyclovir hydrochloride for the treatment of neuropathogenic equine herpesvirus type-1 infection in horses. *American Journal of Veterinary Research* 78, 1126–1139. <https://doi.org/10.2460/ajvr.78.10.1126>
- McGuigan, C., Pathirana, R.N., Migliore, M., Adak, R., Luoni, G., Jones, A.T., Diez-Torrubia, A., Camarasa, M.-J., Velazquez, S., Henson, G., Verbeken, E., Sienaert, R., Naesens, L., Snoeck, R., Andrei, G., Balzarini, J., 2007. Preclinical development of bicyclic nucleoside analogues as potent and selective inhibitors of varicella zoster virus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 1316–1330. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm376>
- McGuigan, C., Yarnold, C.J., Jones, G., Velázquez, S., Barucki, H., Branciale, A., Andrei, G., Snoeck, R., De Clercq, E., Balzarini, J., 1999. Potent and Selective Inhibition of Varicella-Zoster Virus (VZV) by Nucleoside Analogues with an Unusual Bicyclic Base. *J. Med. Chem.* 42, 4479–4484. <https://doi.org/10.1021/jm990346o>
- Mellerick, D.M., Fraser, N.W., 1987. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: Evidence suggesting an episomal state. *Virology* 158, 265–275. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90198-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90198-X)
- Mettenleiter, T.C., 2002. Herpesvirus Assembly and Egress. *JVI* 76, 1537–1547. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1537-1547.2002>
- Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., Granzow, H., 2009. Herpesvirus assembly: An update. *Virus Research* 143, 222–234. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.03.018>
- Migawa, M.T., Girardet, J.-L., Li, J.A.W., Koszalka, G.W., Chamberlain, S.D., Drach, J.C., Townsend, L.B., 1998. Design, Synthesis, and Antiviral Activity of r-Nucleosides: D- and L-Isomers of Lyxofuranosyl- and (5-Deoxylyxofuranosyl)benzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry* 41, 1242–1251.

- Migliore, M., 2010. FV-100: The Most Potent and Selective Anti-Varicella Zoster Virus Agent Reported to Date. *Antivir Chem Chemother* 20, 107–115. <https://doi.org/10.3851/IMP1472>
- Minces, L.R., Nguyen, M.H., Mitsani, D., Shields, R.K., Kwak, E.J., Silveira, F.P., Abdel-Massih, R., Pilewski, J.M., Crespo, M.M., Bermudez, C., Bhama, J.K., Toyoda, Y., Clancy, C.J., 2014. Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infections among Lung Transplant Recipients Are Associated with Poor Outcomes despite Treatment with Foscarnet-Containing Regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 128–135. <https://doi.org/10.1128/AAC.00561-13>
- Morfin, F., Thouvenot, D., De Turenne-Tessier, M., Lina, B., Aymard, M., Ooka, T., 1999. Phenotypic and Genetic Characterization of Thymidine Kinase from Clinical Strains of Varicella-Zoster Virus Resistant to Acyclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2412–2416. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.10.2412>
- Mori, C.M.C., Mori, E., Favaro, L.L., Santos, C.R., Lara, M.C.C.S.H., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S., Brandao, P.E., Richtzenhain, L.J., Maiorka, P.C., 2012. Equid herpesvirus type-1 exhibits neurotropism and neurovirulence in a mouse model. *J. Comp. Pathol.* 146, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.04.003>
- Murray, M.J., Piero, F., Jeffrey, S.C., Davis, M.S., Furr, M.O., Dubovi, E.J., Mayo, J.A., 1998. Neonatal Equine Herpesvirus Type 1 Infection on a Thoroughbred Breeding Farm. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12, 36–41. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1998.tb00494.x>
- Negussie, H., Li, Y., Tessema, T.S., Nauwynck, H.J., 2016. Replication characteristics of equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 3: comparative analysis using ex vivo tissue cultures. *Veterinary Research* 47. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0305-5>
- Neubauer, A., Braun, B., Brandmüller, C., Kaaden, O.-R., Osterrieder, N., 1997. Analysis of the Contributions of the Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein gB Homolog to Virus Entry and Direct Cell-to-Cell Spread. *Virology* 227, 281–294. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8336>
- Neubauer, A., Osterrieder, N., 2004. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) glycoprotein K is required for efficient cell-to-cell spread and virus egress. *Virology* 329, 18–32. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.034>
- Newcomb, W.W., Homa, F.L., Thomsen, D.R., Booy, F.P., Trus, B.L., Steven, A.C., Spencer, J.V., Brown, J.C., 1996. Assembly of the Herpes Simplex Virus Capsid: Characterization of Intermediates Observed During Cell-free Capsid Formation. *Journal of Molecular Biology* 263, 432–446. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0587>
- Nosengo, N., 2016. Faced with skyrocketing costs for developing new drugs, researchers are looking at ways to repurpose older ones — and even some that failed in initial trials. *Nature* 534, 314–316.
- Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K.C., Mumford, J.A., Swann, Z., Newton, J.R., Bowden, R.J., Allen, G.P., Davis-Poynter, N., 2006. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *Journal of Virology* 80, 4047–4060. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006>
- Oberg, B., 1989. ANTIVIRAL EFFECTS OF PHOSPHONOFORMATE (PFA, FOSCARNET SODIUM). *Pharmacology & Therapeutics* 40, 213–285.
- OIE, 2018. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres 2019. Chapitre 3.5.9. Equine rhinopneumonitis (infection with equid herpesvirus-1 and -4).

- Ono, N., Iwayama, S., Suzuki, K., Sekiyama, T., Nakazawa, H., Tsuji, T., Okunishi, M., Daikoku, T., Nishiyama, Y., 1998. Mode of Action of (1JS,2JR)-9-[[1J,2J-Bis(hydroxymethyl)cycloprop-1J-yl]methyl]guanine (A-5021) against Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 and Varicella-Zoster Virus. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.* 42, 8.
- Osterrieder, N., 1999. Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Research* 59, 165–177. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(98\)00134-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(98)00134-8)
- Osterrieder, N., Wagner, R., Brandmüller, C., Schmidt, P., Wolf, H., Kaaden, O.R., 1995. Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14 (gB). *Virology* 208, 500–510. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1181>
- Paillet, R., Case, R., Ross, J., Newton, R., Nugent, J., 2008. Equine herpes virus-1: virus, immunity and vaccines. *The Open Veterinary Science Journal* 2.
- Paillet, R., Pronost, S., 2014. La vaccination contre la rhinopneumonie. *Pratique vétérinaire équin* 181, 3.
- Paillet, R., Prowse, L., Donald, C., Medcalf, E., Montesso, F., Bryant, N., Watson, J., Jeggo, M., Elton, D., Newton, R., Trail, P., Barnes, H., 2010. Efficacy of a whole inactivated E1 vaccine against a recent EIV outbreak isolate and comparative detection of virus shedding. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.03.019>
- Painter, W., Robertson, A., Trost, L.C., Godkin, S., Lampert, B., Painter, G., 2012. First Pharmacokinetic and Safety Study in Humans of the Novel Lipid Antiviral Conjugate CMX001, a Broad-Spectrum Oral Drug Active against Double-Stranded DNA Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2726–2734. <https://doi.org/10.1128/AAC.05983-11>
- Pan, D., Kaye, S.B., Hopkins, M., Kirwan, R., Hart, I.J., Coen, D.M., 2014. Common and New Acyclovir Resistant Herpes Simplex Virus-1 Mutants Causing Bilateral Recurrent Herpetic Keratitis in an Immunocompetent Patient. *The Journal of Infectious Diseases* 209, 345–349. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit437>
- Papazian, D., Würtzen, P.A., Hansen, S.W.K., 2016. Polarized Airway Epithelial Models for Immunological Co-Culture Studies. *Int Arch Allergy Immunol* 170, 1–21. <https://doi.org/10.1159/000445833>
- Pasdeloup, D., Blondel, D., Isidro, A.L., Rixon, F.J., 2009. Herpesvirus Capsid Association with the Nuclear Pore Complex and Viral DNA Release Involve the Nucleoporin CAN/Nup214 and the Capsid Protein pUL25. *JVI* 83, 6610–6623. <https://doi.org/10.1128/JVI.02655-08>
- Pastuch-Gawołek, G., Gillner, D., Król, E., Walczak, K., Wandzik, I., 2019. Selected nucleos(t)ide-based prescribed drugs and their multi-target activity. *European Journal of Pharmacology* 865. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172747>
- Patel, J.R., Edington, N., Mumford, J.A., 1982. Variation in cellular tropism between isolates of Equine herpesvirus-1 in Foals. *Archives of Virology* 74, 41–51. <https://doi.org/10.1007/BF01320781>
- Patel, J.R., Heldens, J., 2005. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *The Veterinary Journal* 170, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.04.018>

- Pennington, M.R., Fort, M.W., Ledbetter, E.C., Van de Walle, G.R., 2016. A novel corneal explant model system to evaluate antiviral drugs against feline herpesvirus type 1 (FHV-1). *J. Gen. Virol.* 97, 1414–1425. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000451>
- Perdue, M.L., Kemp, M.C., Randall, C.C., O’Callaghan, D.J., 1974. Studies of the molecular anatomy of the L-M cell strain of equine herpes virus type 1: Proteins of the nucleocapsid and intact virion. *Virology* 59, 201–216. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90216-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90216-5)
- Perkins, G.A., Goodman, L.B., Tsujimura, K., Van de Walle, G.R., Kim, S.G., Dubovi, E.J., Osterrieder, N., 2009. Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984–2007). *Veterinary Microbiology* 139, 375–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.033>
- Piret, J., Boivin, G., 2019. Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Research* 163, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.011>
- Piret, J., Boivin, G., 2016. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Current Opinion in Infectious Diseases* 29, 654–662. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000288>
- Piret, J., Boivin, G., 2014. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus: Herpesviruses antiviral drug resistance. *Rev. Med. Virol.* 24, 186–218. <https://doi.org/10.1002/rmv.1787>
- Piret, J., Boivin, G., 2011. Resistance of Herpes Simplex Viruses to Nucleoside Analogues: Mechanisms, Prevalence, and Management. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 459–472. <https://doi.org/10.1128/AAC.00615-10>
- Piret, J., Goyette, N., Boivin, G., 2016. Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 54, 2120–2127. <https://doi.org/10.1128/JCM.03274-15>
- Plummer, G., Waterson, A.P., 1963. Equine Herpes Virus. *Virology* 412–416.
- Poelaert, K.C.K., Van Cleemput, J., Laval, K., Favoreel, H.W., Couck, L., Van den Broeck, W., Azab, W., Nauwynck, H.J., 2019. Equine herpesvirus 1 bridges T-lymphocytes to reach its target organs. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/JVI.02098-18>
- Poelaert, K.C.K., Van Cleemput, J., Laval, K., Favoreel, H.W., Soboll Hussey, G., Maes, R.K., Nauwynck, H.J., 2018. Abortigenic but Not Neurotropic Equine Herpes Virus 1 Modulates the Interferon Antiviral Defense. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00312>
- Pol, J.M.A., Broekhuysen-Davies, J.M., 1991. The influence of porcine recombinant interferon-tl on pseudorabies virus infection of porcine nasal mucosa in vitro. *Journal of General Virology* 72, 933–938.
- Polis, M.A., Spooner, K.M., Baird, B.F., Manischewitz, J.F., Jaffe, H.S., Fisher, P.E., Falloon, J., Davey, R.T., Kovacs, J.A., Walker, R.E., 1995. Anticytomegaloviral activity and safety of cidofovir in patients with human immunodeficiency virus infection and cytomegalovirus viraemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 882–886. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.4.882>
- Pope, L.E., Marcelletti, J.F., Katz, L.R., Lin, J.Y., Katz, D.H., Parish, M.L., Spear, P.G., 1998. The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process. *Antiviral Research* 40, 85–94. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(98\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(98)00048-5)

- Pronost, S., Legrand, L., Pitel, P.-H., Wegge, B., Lissens, J., Freymuth, F., Richard, E., Fortier, G., 2012. Outbreak of Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy in France: a Clinical and Molecular Investigation: Outbreak of EHV-1 myeloencephalopathy. *Transboundary and Emerging Diseases* 59, 256–263. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01263.x>
- Pronost, S., Léon, A., Legrand, L., Fortier, C., Miszczak, F., Freymuth, F., Fortier, G., 2010. Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Veterinary Microbiology* 145, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.031>
- Prusoff, J.J.A., 1960. The Effect of 5-Iododeoxyuridine upon the Growth of Some Transplantable Rodent Tumors. *Cancer Research* 20, 1383–1388.
- Prusoff, W.H., 1959. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochimica et Biophysica Acta* 32, 295–296. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90597-9](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90597-9)
- Purewal A. S., Allsopp R., Riggio M., Telford E. A. R., Azam S., Davison A. J., Edington N., 1994. Equid Herpesvirus 1 and 4 encode functional homologs of the Herpes Simplex Virus Type 1 transactivator protein, VP16. *Virology* 198, 385–389.
- Pusterla, N., Hussey, G.S., 2014. Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 30, 489–506. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.006>
- Pusterla, N., Mapes, S., Akana, N., Barnett, C., MacKenzie, C., Gaughan, E., Craig, B., Chappell, D., Vaala, W., 2016. Prevalence factors associated with equine herpesvirus type 1 infection in equids with upper respiratory tract infection and/or acute onset of neurological signs from 2008 to 2014. *Veterinary Record*. <https://doi.org/10.1136/vr.103424>
- Pusterla, N., Mapes, S., David Wilson, W., 2012. Prevalence of latent alpha-herpesviruses in Thoroughbred racing horses. *The Veterinary Journal* 193, 579–582. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.01.030>
- Pusterla, N., Mapes, S., Wilson, W.D., 2010. Prevalence of equine herpesvirus type 1 in trigeminal ganglia and submandibular lymph nodes of equids examined postmortem. *Veterinary Record* 167, 376–379. <https://doi.org/10.1136/vr.c3748>
- Pusterla, N., Wilson, W.D., Mapes, S., Finno, C., Isbell, D., Arthur, R.M., Ferraro, G.L., 2009. Characterization of viral loads, strain and state of equine herpesvirus-1 using real-time PCR in horses following natural exposure at a racetrack in California. *Vet. J.* 179, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.09.018>
- Quenelle, D.C., Collins, D.J., Rice, T.L., Rahman, A., Glazer, R., 2011. Efficacy of orally administered low dose N-methanocarbothymidine against lethal herpes simplex virus type-2 infections of mice. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 22, 131–137.
- Quintana, A.M., Landolt, G.A., Annis, K.M., Hussey, G.S., 2011. Immunological characterization of the equine airway epithelium and of a primary equine airway epithelial cell culture model. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 140, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.12.008>
- Raaperi, K., Orro, T., Viltrop, A., 2014. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *Vet. J.* 201, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.040>
- Rajcani, J., Durmanova, V., 2001. Mechanisms of replication of alpha- and betaherpesviruses and their pathogenesis. *Bratisl Lek Listy* 102, 505–514.

- Razonable, R.R., 2018. Drug-resistant cytomegalovirus: clinical implications of specific mutations. *Current Opinion in Organ Transplantation* 23, 388–394. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000541>
- Razonable, R.R., 2011. Antiviral Drugs for Viruses Other Than Human Immunodeficiency Virus. *Mayo Clinic Proceedings* 86, 1009–1026. <https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0309>
- Rebhun, W.C., Jenkins, D.H., Riis, R.C., Dill, S.G., Dubovi, E.J., Torres, A., 1988. An epizootic of blindness and encephalitis associated with a herpesvirus indistinguishable from equine herpesvirus 1 in a herd of alpacas and llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 953–956.
- Reed, S.M., Toribio, R.E., 2004. Equine herpesvirus 1 and 4. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 20, 631–642. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2004.09.001>
- Riaz, A., Kifayatullah, M.-U.-H., Akhtar, N., 2017. Recent Understanding of the Classification and Life Cycle of Herpesviruses: A Review 5, 195–207.
- Roizmann, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., Studdert, M.J., 1992. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 123, 425–449. <https://doi.org/10.1007/BF01317276>
- Rollinson, E.A., 1987. Comparative efficacy of three 2'-fluoropyrimidine nucleosides and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine (BW B759U) against pseudorabies and equine rhinopneumonitis virus infection in vitro and in laboratory animals. *Antiviral Research* 7, 25–33. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(87\)90036-2](https://doi.org/10.1016/0166-3542(87)90036-2)
- Rollinson, E.A., White, G., 1983. Relative activities of acyclovir and BW759 against Aujeszky's disease and equine rhinopneumonitis viruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 24, 221–226.
- Saade, G., Ménard, D., Hervet, C., Renson, P., Hue, E., Zhu, J., Dubreil, L., Paillot, R., Pronost, S., Bourry, O., Simon, G., Dupont, J., Bertho, N., Meurens, F., 2020. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interferes with Swine Influenza A Virus Infection of Epithelial Cells. *Vaccines* 8, 508. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030508>
- Sacks, S.L., Thisted, R.A., Jones, T.M., Barbarash, R.A., Mikolich, D.J., Ruoff, G.E., Jorizzo, J.L., Gunnilla, L.B., Katz, D.H., Khalil, M.H., Morrow, P.R., Yakatan, G.J., Pope, L.E., Berga, J.E., 2001. Clinical efficacy of topical docosanol 10% cream for herpes simplex labialis: A multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45, 222–230. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.116215>
- Sagar, S., Kaur, M., Minneman, K.P., 2010. Antiviral Lead Compounds from Marine Sponges. *Marine Drugs* 8, 2619–2638. <https://doi.org/10.3390/md8102619>
- Saint-Léger, E., Caumes, E., Breton, G., Douard, D., Saiag, P., Huraux, J., Bricaire, F., Agut, H., Fillet, A., 2001. Clinical and Virologic Characterization of Acyclovir-Resistant Varicella-Zoster Viruses Isolated from 11 Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *CLIN INFECT DIS* 33, 2061–2067. <https://doi.org/10.1086/324503>
- Samorek-Salamonovicz, E., Cakala, A., Wijaszka, T., 1987. Effect of acyclovir on the replication of turkey herpesvirus and Mrek's disease virus. *Research in Veterinary Science* 42, 334–338.
- Sasadeusz, J.J., Tufaro, F., Safrin, S., Schubert, K., Hubinette, M.M., Cheung, P.K., Sacks, S.L., 1997. Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. *Journal of virology* 71, 3872–3878. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.5.3872-3878.1997>
- Sasaki, M., Hasebe, R., Makino, Y., Suzuki, T., Fukushi, H., Okamoto, M., Matsuda, K., Taniyama, H., Sawa, H., Kimura, T., 2011. Equine major histocompatibility complex

- class I molecules act as entry receptors that bind to equine herpesvirus-1 glycoprotein D: MHC class I acts as a EHV-1gD receptor. *Genes to Cells* 16, 343–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01491.x>
- Sauerbrei, A., Bohn-Wippert, K., Kaspar, M., Krumbholz, A., Karrasch, M., Zell, R., 2016. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 6–16. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv285>
- Saxegaard, F., 1966. Isolation and identification of equine rhinopneumonitis virus (equine abortion virus) from cases of abortion and paralysis. *Nord Vet Med* 504–512.
- Schabel, F.M., 1968. The antiviral activity of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine (ARA-A). *Chemotherapia (Basel)* 13, 321–338. <https://doi.org/10.1159/000220567>
- Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J., Collins, P., 1978. 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* 272, 583–585. <https://doi.org/10.1038/272583a0>
- Schmidt, S., Bohn-Wippert, K., Schlattmann, P., Zell, R., Sauerbrei, A., 2015. Sequence Analysis of Herpes Simplex Virus 1 Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes from over 300 Clinical Isolates from 1973 to 2014 Finds Novel Mutations That May Be Relevant for Development of Antiviral Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4938–4945. <https://doi.org/10.1128/AAC.00977-15>
- Schmitt, D.L., Hardy, D.A., Montali, R.J., Richman, L.K., Lindsay, W.A., Isaza, R., West, G., 2000. USE OF FAMCICLOVIR FOR THE TREATMENT OF ENDOTHELIO-TROPHIC HERPESVIRUS INFECTIONS IN ASIAN ELEPHANTS (*ELEPHAS MAXIMUS*). *zamd* 31, 518–522. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0518:UOFFTT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0518:UOFFTT]2.0.CO;2)
- Schrenzel, M.D., Tucker, T.A., Donovan, T.A., Busch, M.D.M., Wise, A.G., Maes, R.K., Kiupel, M., 2008. New Hosts for Equine Herpesvirus 9. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1616–1619. <https://doi.org/10.3201/eid1410.080703>
- Scott, J.C., Dutta, S.K., Myrup, A.C., 1983. In vivo harboring of equine herpesvirus-1 in leukocyte populations and subpopulations and their quantitation from experimentally infected ponies. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1344–1348.
- Scrochi, M., Zanuzzi, C., Fuentealba, N., Nishida, F., Bravi, M., Pacheco, M., Sguazza, G., Gimeno, E., Portiansky, E., Muglia, C., Galosi, C., Barbeito, C., 2017. Investigation of apoptosis in cultured cells infected with equine herpesvirus 1. *Biotechnic & Histochemistry* 1–9. <https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1359749>
- Sekiyama, T., Hatsuya, S., Tanaka, Y., Uchiyama, M., Ono, N., Iwayama, S., Oikawa, M., Suzuki, K., Okunishi, M., Tsuji, T., 1998. Synthesis and Antiviral Activity of Novel Acyclic Nucleosides: Discovery of a Cyclopropyl Nucleoside with Potent Inhibitory Activity against Herpesviruses. *J. Med. Chem.* 41, 1284–1298. <https://doi.org/10.1021/jm9705869>
- Serafin, M.B., Bottega, A., Foletto, V.S., da Rosa, T.F., Hörner, A., Hörner, R., 2020. Drug repositioning is an alternative for the treatment of coronavirus COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents* 55. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105969>
- Shepp, D.H., Dandliker, P.S., Meyers, J.D., 1986. Treatment of varicella-zoster virus infection in severely immunocompromised patients. A randomized comparison of acyclovir and vidarabine. *N. Engl. J. Med.* 314, 208–212. <https://doi.org/10.1056/NEJM198601233140404>

- Shiraki, K., 2018. Antiviral Drugs Against Alphaherpesvirus, in: Kawaguchi, Y., Mori, Y., Kimura, H. (Eds.), *Human Herpesviruses, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore, Singapore, pp. 103–122. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_6
- Shope, T.C., Kauffman, R.E., Bowman, D., Marcus, E.L., 1983. Pharmacokinetics of Vidarabine in the Treatment of Infants and Children with Infections Due to Herpesviruses. *Journal of Infectious Diseases* 148, 721–725. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.4.721>
- Sidwell, R.W., Arnett, G., Schabel, jr., F.M., 1972. *In vitro* Effect of a Variety of Biologically Active Compounds on Human Cytomegalovirus. *Chemotherapy* 17, 259–282. <https://doi.org/10.1159/000220858>
- Siedek, E.M., Whelan, M., Edington, N., Hamblin, A., 1999. Equine herpesvirus type 1 infects dendritic cells in vitro: stimulation of T lymphocyte proliferation and cytotoxicity by infected dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 67, 17–32. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00203-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00203-7)
- Singh, B.K., Ahuja, S., Gulati, B.R., 2004. Development of a neutralizing monoclonal antibody-based blocking ELISA for detection of equine herpesvirus 1 antibodies. *Vet. Res. Commun.* 28, 437–446. <https://doi.org/10.1023/b:verc.0000034996.18533.90>
- Slater, J.D., Borchers, K., Thackray, A.M., Field, H.J., 1994. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology* 75, 2007–2016. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-8-2007>
- Slater, J.D., Gibson, J.S., Barnett, K.C., Field, H.J., 1992. Chorioretinopathy associated with neuropathology following infection with equine herpesvirus-1. *Vet. Rec.* 131, 237–239. <https://doi.org/10.1136/vr.131.11.237-a>
- Slater, J.D., Gibson, J.S., Field, H.J., 1993. Pathogenicity of a Thymidine Kinase-Deficient Mutant of Equine Herpesvirus 1 in Mice and Specific Pathogen-Free Foals. *Journal of General Virology* 74, 819–828. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-5-819>
- Sloan, B.J., Kiely, K., Miller, F.A., 1977. Effect of a novel adenosine deaminase inhibitor (co-vidarabine, co-v) upon the antiviral activity in vitro and in vivo of vidarabine (virA-A) for the DNA virus replication. *Annals of the New York Academy of Sciences* 4, 60–80.
- Smith, D.J., Iqbal, J., Purewal, A., Hamblin, A.S., Edington, N., 1998. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD5M/CD8M leukocytes indirectly by IL-2 or chorionic gonadotrophin. *Journal of General Virology* 79, 2997–3004.
- Smith, K., Whitwell, K., Mumford, J., Hannant, D., Blunden, A., Tearle, J., 2000. Virulence of the V592 Isolate of Equid Herpesvirus-1 in Ponies. *Journal of Comparative Pathology* 122, 288–297. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0373>
- Smith, K.C., Borchers, K., 2001. A Study of the Pathogenesis of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) Abortion by DNA In-situ Hybridization. *Journal of Comparative Pathology* 125, 304–310. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0513>
- Smith, K.C., McGladdery, A.J., Binns, M.M., Mumford, J.A., 1997. Use of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis for detection of equid herpesvirus 1-induced fetal infection in utero. *Am. J. Vet. Res.* 58, 997–1002.
- Smith, K.C., Mumford, J.A., Lakhani, K., 1996. A comparison of equid herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus. *Journal of Comparative Pathology* 114, 231–247. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(96\)80045-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(96)80045-4)
- Smith, K.C., Whitwell, K.E., Mumford, J.A., Gower, S.M., Hannant, D., Tearle, J.P., 1993. An immunohistological study of the uterus of mares following experimental infection by

- Equid herpesvirus 1. *Equine Veterinary Journal* 25, 36–40. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb02898.x>
- Smith, K.L., Allen, G.P., Branscum, A.J., Frank Cook, R., Vickers, M.L., Timoney, P.J., Balasuriya, U.B.R., 2010. The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Veterinary Microbiology* 141, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.030>
- Smith, K.O., Galloway, K.S., Kennell, W.L., Ogilvie, K.K., Radatus, B.K., 1982. A new nucleoside analog, 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxyl]methyl]guanine, highly active in vitro against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22, 55–61. <https://doi.org/10.1128/aac.22.1.55>
- Smith, R.H., Caughman, G.B., O’Callaghan, D.J., 1992. Characterization of the regulatory functions of the equine herpesvirus 1 immediate-early gene product. *J. Virol.* 66, 936–945. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.2.936-945.1992>
- Soboll, G., Breathnach, C.C., Kydd, J.H., Hussey, S.B., Mealey, R.M., Lunn, D.P., 2010. Vaccination of ponies with the IE gene of EHV-1 in a recombinant modified live vaccinia vector protects against clinical and virological disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.11.009>
- Soboll, G., Hussey, S.B., Whalley, J.M., Allen, G.P., Koen, M.T., Santucci, N., Fraser, D.G., Macklin, M.D., Swain, W.F., Lunn, D.P., 2006. Antibody and cellular immune responses following DNA vaccination and EHV-1 infection of ponies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 81–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.011>
- Soboll Hussey, G., Hussey, S.B., Wagner, B., Horohov, D.W., Van de Walle, G.R., Osterrieder, N., Goehring, L.S., Rao, S., Lunn, D.P., 2011. Evaluation of immune responses following infection of ponies with an EHV-1 ORF1/2 deletion mutant. *Vet Res* 42, 23. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-23>
- Sodeik, B., Ebersold, M.W., Helenius, A., 1997. Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *Journal of Cell Biology* 136, 1007–1021. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.5.1007>
- Soul-Lawton, J., Seaber, E., On, N., Wootton, R., Rolan, P., Posner, J., 1995. Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2759–2764. <https://doi.org/10.1128/aac.39.12.2759>
- Spear, P.G., Longnecker, R., 2003. Herpesvirus Entry: an Update. *JVI* 77, 10179–10185. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10179-10185.2003>
- Spector, F.C., Liang, L., Giordano, H., Sivaraja, M., Peterson, M.G., 1998. Inhibition of Herpes Simplex Virus Replication by a 2-Amino Thiazole via Interactions with the Helicase Component of the UL5-UL8-UL52 Complex. *J. Virol.* 72, 6979–6987. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.6979-6987.1998>
- Spertus, C.B., Mohammed, H.O., Ledbetter, E.C., 2016. Effects of topical ocular application of 1% trifluridine ophthalmic solution in dogs with experimentally induced recurrent ocular canine herpesvirus-1 infection. *Am. J. Vet. Res.* 77, 1140–1147. <https://doi.org/10.2460/ajvr.77.10.1140>
- Spiegschaert, B., Osterrieder, N., Azab, W., 2015. Comparative Analysis of Glycoprotein B (gB) of Equine Herpesvirus Type 1 and Type 4 (EHV-1 and EHV-4) in Cellular Tropism and Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* 7, 522–542. <https://doi.org/10.3390/v7020522>

- Spradbrow, P.B., Carlisle, C., Watt, D.A., 1971. The association of a herpesvirus with generalised disease in a kitten. *Vet. Rec.* 89, 542–544. <https://doi.org/10.1136/vr.89.20.542>
- Spruance, S.L., 2002. N-docosanol (Abreva) for herpes labialis: Problems and questions. *Journal of the American Academy of Dermatology* 47, 457–458. <https://doi.org/10.1067/mjd.2002.122743>
- St Clair, M.H., Miller, W.H., Miller, R.L., Lambe, C.U., Furman, P.A., 1984. Inhibition of cellular alpha DNA polymerase and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by the triphosphate of BW759U. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25, 191–194. <https://doi.org/10.1128/aac.25.2.191>
- Stanton, J.J., Zong, J.-C., Eng, C., Howard, L., Flanagan, J., Stevens, M., Schmitt, D., Wiedner, E., Graham, D., Junge, R.E., Weber, M.A., Fischer, M., Mejia, A., Tan, J., Latimer, E., Herron, A., Hayward, G.S., Ling, P.D., 2013. Kinetics of viral loads and genotypic analysis of elephant endotheliotropic herpesvirus-1 infection in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 44, 42–54. <https://doi.org/10.1638/1042-7260-44.1.42>
- Steukers, L., Vandekerckhove, A.P., Van den Broeck, W., Glorieux, S., Nauwynck, H.J., 2012. Kinetics of BoHV-1 Dissemination in an in Vitro Culture of Bovine Upper Respiratory Tract Mucosa Explants. *ILAR Journal* 53, E43–E54. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.1.43>
- Stokes, A., Allen, G.P., Pullen, L.A., Murray, P.K., 1989. A hamster model of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection; passive protection by monoclonal antibodies to EHV-1 glycoproteins 13, 14 and 17/18. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-5-1173>
- Su, Y.-H., Moxley, M.J., Ng, A.K., Lin, J., Jordan, R., Fraser, N.W., Block, T.M., 2002. Stability and circularization of herpes simplex virus type 1 genomes in quiescently infected PC12 cultures. *Journal of General Virology* 83, 2943–2950. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-2943>
- Sugawara, M., Huang, W., Fei, Y.-J., Leibach, F.H., Ganapathy, V., Ganapathy, M.E., 2000. Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Journal of pharmaceutical sciences* 89, 9.
- Sun, P., Zhang, S., Li, Y., Wang, L., 2014. Harmine mediated neuroprotection via evaluation of glutamate transporter 1 in a rat model of global cerebral ischemia. *Neuroscience Letters* 583, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.023>
- Sutton G., Garvey M., Cullinane A., Jourdan M., Fortier C., Moreau P., Foursin M., Gryspeerdt A., Maisonnier V., Marcillaud-Pitel C., Legrand L., Paillot R., Pronost S., 2019. Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion. *Viruses* 11, 916. <https://doi.org/10.3390/v11100916>
- Tallmadge, R.L., Žygelytė, E., Van de Walle, G.R., Kristie, T.M., Felipe, M.J.B., 2018. Effect of a Histone Demethylase Inhibitor on Equine Herpesvirus-1 Activity In Vitro. *Frontiers in Veterinary Science* 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00034>
- Taniguchi, A., Fukushi, H., Matsumura, T., Yanai, T., Masegi, T., Hirai, K., 2000. Pathogenicity of a New Neurotropic Equine Herpesvirus 9(Gazelle Herpesvirus 1) in Horses. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 215–218. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.215>
- Telford, E., Watson, M., McBride, K., Davidson, A., 1992a. The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-1. *Virology* 304–316.

- Telford, E., Watson, M., McBride, K., Davidson, A., 1992b. The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-1. *Virology* 304–316.
- Teng, Z., Kuang, X., Wang, J., Zhang, X., 2013. Real-time cell analysis – A new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *Journal of Virological Methods* 193, 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.034>
- Thieulent, C., Fortier, C., Munier-Lehmann, H., Suzanne, P., Dallemagne, P., Zientara, S., Hans, A., Vidalain, P.-O., Pronost, S., Hue, E.S., 2020a. Screening of potential antiviral molecules against equid herpesvirus 1 using cellular impedance measurement: dataset of 2,891 compounds. Data in brief En révision.
- 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., 2020b. Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: Efficacy of decitabine and valganciclovir alone or in combination. *Antiviral Research* 183, 104931. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104931>
- 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., 2019. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology* 526, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.013>
- Thomasy, S.M., Maggs, D.J., 2016. A review of antiviral drugs and other compounds with activity against feline herpesvirus type 1. *Vet Ophthalmol* 19 Suppl 1, 119–130. <https://doi.org/10.1111/vop.12375>
- Thormann, N., Van de Walle, G.R., Azab, W., Osterrieder, N., 2012. The role of secreted glycoprotein G of equine herpesvirus type 1 and type 4 (EHV-1 and EHV-4) in immune modulation and virulence. *Virus Research* 169, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.07.029>
- Tippin, T.K., Morrison, M.E., Brundage, T.M., Momméja-Marin, H., 2016. Brincidofovir Is Not a Substrate for the Human Organic Anion Transporter 1: A Mechanistic Explanation for the Lack of Nephrotoxicity Observed in Clinical Studies. *Ther Drug Monit* 38, 10.
- Tsujimura, K., Yamada, M., Nagata, S., Yamanaka, T., Nemoto, M., Kondo, T., Kurosawa, M., Matsumura, T., 2010. Pharmacokinetics of penciclovir after oral administration of its prodrug famciclovir to horses. *Journal of Veterinary Medical Science* 72, 357–361.
- Turner, L.D., Beckingsale, 2013. Acyclovir-resistant herpetic keratitis in a solid-organ transplant recipient on systemic immunosuppression. *OPHTH* 229. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S39113>
- Turowska, A., Pajak, B., Godlewski, M.M., Dzieciatkowski, T., Chmielewska, A., Tucholska, A., Banbura, M., 2010. Opposite effects of two different strains of equine herpesvirus 1 infection on cytoskeleton composition in equine dermal ED and African green monkey kidney Vero cell lines: application of scanning cytometry and confocal-microscopy-based image analysis in a quantitative study. *Archives of Virology* 155, 733–743. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0622-3>
- Tyring, S.K., Lee, P., Hill, G.T., Silverfield, J.C., Moore, A.Y., Matkovits, T., Sullivan-Bolyai, J., 2017. FV-100 versus valacyclovir for the prevention of post-herpetic neuralgia and the treatment of acute herpes zoster-associated pain: A randomized-controlled trial. *J. Med. Virol.* 89, 1255–1264. <https://doi.org/10.1002/jmv.24750>

- Van Cleemput, J., Poelaert, K.C.K., Laval, K., Impens, F., Van den Broeck, W., Gevaert, K., Nauwynck, Hans.J., 2019. Pollens destroy respiratory epithelial cell anchors and drive alphaherpesvirus infection. *Sci Rep* 9, 4787. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41305-y>
- Van de Walle, G.R., Peters, S.T., VanderVen, B.C., O'Callaghan, D.J., Osterrieder, N., 2008. Equine Herpesvirus 1 Entry via Endocytosis Is Facilitated by α V Integrins and an RSD Motif in Glycoprotein D. *JVI* 82, 11859–11868. <https://doi.org/10.1128/JVI.00868-08>
- van der Beek, M.T., Vermont, C.L., Bredius, R.G.M., Marijt, E.W.A., van der Blij-de Brouwer, C.S., Kroes, A.C.M., Claas, E.C.J., Vossen, A.C.T.M., 2013. Persistence and Antiviral Resistance of Varicella Zoster Virus in Hematological Patients. *Clinical Infectious Diseases* 56, 335–343. <https://doi.org/10.1093/cid/cis879>
- van Maanen, C., 2002. Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet Q* 24, 58–78.
- van Maanen, C., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., Damen, E.A., Derksen, A.G., 2001. Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Vet. J.* 33, 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2001.tb00600.x>
- Vandekerckhove, A.P., Glorieux, S., Gryspeerdt, A.C., Steukers, L., Duchateau, L., Osterrieder, N., Van de Walle, G.R., Nauwynck, H.J., 2010. Replication kinetics of neurovirulent versus non-neurovirulent equine herpesvirus type 1 strains in equine nasal mucosal explants. *Journal of General Virology* 91, 2019–2028. <https://doi.org/10.1099/vir.0.019257-0>
- Vandekerckhove, A.P., Glorieux, S., Gryspeerdt, A.C., Steukers, L., Van Doorselaere, J., Osterrieder, N., Van de Walle, G.R., Nauwynck, H.J., 2011. Equine alphaherpesviruses (EHV-1 and EHV-4) differ in their efficiency to infect mononuclear cells during early steps of infection in nasal mucosal explants. *Veterinary Microbiology* 152, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.038>
- Vinckier, F., Boogaerts, M., Clerck, D.D., Clercq, E.D., 1987. Chronic herpetic infection in an immunocompromised patient: Report of a case. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 45, 723–728. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(87\)90320-X](https://doi.org/10.1016/0278-2391(87)90320-X)
- Vissani, M.A., Becerra, M.L., Perglione, C.O., Tordoya, M.S., 2009. Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Veterinary Microbiology* 139, 361–364.
- Vissani, M.A., Thiry, E., Dal Pozzo, F., Barrandeguy, M., 2016. Antiviral agents against equid alphaherpesviruses: Current status and perspectives. *The Veterinary Journal* 207, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.010>
- Wald, A., Corey, L., Timmler, B., Magaret, A., Warren, T., Tyring, S., Johnston, C., Kriesel, J., Fife, K., Galitz, L., Stoelben, S., Huang, M.-L., Selke, S., Stobernack, H.-P., Ruebsamen-Schaeff, H., Birkmann, A., 2014. Helicase–Primase Inhibitor Pritelivir for HSV-2 Infection. *New England Journal of Medicine* 370, 201–210. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301150>
- Wald, A., Timmler, B., Magaret, A., Warren, T., Tyring, S., Johnston, C., Fife, K., Selke, S., Huang, M.-L., Stobernack, H.-P., Zimmermann, H., Corey, L., Birkmann, A., Ruebsamen-Schaeff, H., 2016. Effect of Pritelivir Compared With Valacyclovir on Genital HSV-2 Shedding in Patients With Frequent Recurrences: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 316, 2495–2503. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.18189>

- Wallner, B.C., Harréus, U.A., Gamarra, F., Sassen, A., Kleinsasser, N.H., 2005. Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa: Ein Modell für ökogenotoxikologische Untersuchungen. *HNO* 53, 1037–1046. <https://doi.org/10.1007/s00106-005-1243-0>
- Wang, J., Sun, P., Feng, Y., Guo, J., Sun, Y., Lei, H., Xu, J., Li, H., 2016. Sodium tanshinone IIA sulfonate affects Marek's disease virus replication by inhibiting gB expression. *Pharmaceutical Biology* 54, 701–704. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1072568>
- Wang, L.H., Peck, R.W., Yin, Y., Allanson, J., Wiggs, R., Wire, M.B., 2003. Phase I Safety and Pharmacokinetic Trials of 1263W94, a Novel Oral Anti-Human Cytomegalovirus Agent, in Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Subjects. *AAC* 47, 1334–1342. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1334-1342.2003>
- Weinberg, A., Leary, J.J., Sarisky, R.T., Levin, M.J., 2007. Factors that affect in vitro measurement of the susceptibility of herpes simplex virus to nucleoside analogues. *Journal of Clinical Virology* 38, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.08.023>
- Welch, H.M., Bridges, C.G., Lyon, A.M., Griffiths, L., Edington, N., 1992. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *Journal of General Virology* 73, 261–268. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-2-261>
- Wellington, J.E., Love, D.N., Whalley, J.M., 1996. Evidence for involvement of equine herpesvirus 1 glycoprotein B in cell-cell fusion. *Archives of Virology* 141, 167–175. <https://doi.org/10.1007/BF01718598>
- Whitley, R.J., Ch'ien, L.T., Dolin, R., Galasso, G.J., Alford, C.A., 1976. Adenine arabinoside therapy of herpes zoster in the immunosuppressed. NIAID collaborative antiviral study. *N. Engl. J. Med.* 294, 1193–1199. <https://doi.org/10.1056/NEJM197605272942201>
- Whitley, R.J., Gnann, J.W., Hinthorn, D., Liu, C., Pollard, R.B., Hayden, F., Mertz, G.J., Oxman, M., Soong, S.-J., NIAID Collaborative Antiviral Study Group, 1992. Disseminated Herpes Zoster in the Immunocompromised Host: A Comparative Trial of Acyclovir and Vidarabine. *Journal of Infectious Diseases* 165, 450–455. <https://doi.org/10.1093/infdis/165.3.450>
- Whitley, R.J., Tucker, B.C., Kinkel, A.W., Barton, N.H., Pass, R.F., Whelchel, J.D., Cobbs, C.G., Diethelm, A.G., Buchanan, R.A., 1980. Pharmacology, Tolerance, and Antiviral Activity of Vidarabine Monophosphate in Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 18, 709–715. <https://doi.org/10.1128/AAC.18.5.709>
- Whitwell, K.E., Blunden, A.S., 1992. Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) infection. *Equine Veterinary Journal* 24, 13–19. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1992.tb02771.x>
- Wildum, S., Zimmermann, H., Lischka, P., 2015. In Vitro Drug Combination Studies of Letemovir (AIC246, MK-8228) with Approved Anti-Human Cytomegalovirus (HCMV) and Anti-HIV Compounds in Inhibition of HCMV and HIV Replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, 3140–3148. <https://doi.org/10.1128/AAC.00114-15>
- Wildy, P., 1973. in *The Herpesviruses*, Kaplan, (A. S., ed.), pp. 1., Academic Press.
- Wilhelmus, K.R., 2010. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis, in: *The Cochrane Collaboration* (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002898.pub4>

- Wilkins, P.A., Papich, M., Sweeney, R.W., 2005. Pharmacokinetics of acyclovir in adult horses. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 15, 174–178. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2005.00145.x>
- Williams, S.L., Hartline, C.B., Kushner, N.L., Harden, E.A., Bidanset, D.J., Drach, J.C., Townsend, L.B., Underwood, M.R., Biron, K.K., Kern, E.R., 2003. In Vitro Activities of Benzimidazole D- and L-Ribonucleosides against Herpesviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 2186–2192. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2186-2192.2003>
- Wilson, W.D., 1997. Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 13, 53–72. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30255-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30255-9)
- Wilsterman, S., Soboll-Hussey, G., Lunn, D.P., Ashton, L.V., Callan, R.J., Hussey, S.B., Rao, S., Goehring, L.S., 2011. Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet. Microbiol.* 149, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.004>
- Winston, D.J., Saliba, F., Blumberg, E., Abouljoud, M., Garcia-Diaz, J.B., Goss, J.A., Clough, L., Avery, R., Limaye, A.P., Ericzon, B.G., Navasa, M., Troisi, R.I., Chen, H., Villano, S.A., Uknis, M.E., for the 1263-301 Clinical Study Group, 2012. Efficacy and Safety of Maribavir Dosed at 100 mg Orally Twice Daily for the Prevention of Cytomegalovirus Disease in Liver Transplant Recipients: A Randomized, Double-Blind, Multicenter Controlled Trial: Maribavir Prevention of CMV in Liver Transplant. *American Journal of Transplantation* 12, 3021–3030. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04231.x>
- Winston, D.J., Young, J.-A.H., Pullarkat, V., Papanicolaou, G.A., Vij, R., Vance, E., Alangaden, G.J., Chemaly, R.F., Petersen, F., Chao, N., Klein, J., Sprague, K., Villano, S.A., Boeckh, M., 2008. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant recipients: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Blood* 111, 5403–5410. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-121558>
- Wong, D.M., Maxwell, L.K., Wilkins, P.A., 2010. Use of antiviral medications against equine herpes virus associated disorders. *Equine Veterinary Education* 22, 244–252. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2010.00048.x>
- Xiong, X., Smith, J.L., Chen, M.S., 1997. Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 594–599. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.594>
- Yaldiz, M., Solak, B., Kara, R.O., Cosansu, N., Erdem, M.T., 2016. Comparison of Famciclovir, Valaciclovir, and Brivudine Treatments in Adult Immunocompetent Patients With Herpes Zoster. *American Journal of Therapeutics* 0, 1–9. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000436>
- Yanai, T., Fujishima, N., Fukushi, H., Hirata, A., Sakai, H., Masegi, T., 2003. Experimental infection of equine herpesvirus 9 in dogs. *Vet. Pathol.* 40, 263–267. <https://doi.org/10.1354/vp.40-3-263>
- Young, P.G., Rubin, J., Angarone, M., Flaherty, J., Penugonda, S., Stosor, V., Ison, M.G., 2016. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: a single-center retrospective cohort study. *Transpl Infect Dis* 18, 390–395. <https://doi.org/10.1111/tid.12537>
- Yuan, C., Fu, X., Huang, L., Ma, Y., Ding, X., Zhu, L., Zhu, G., 2016. The synergistic antiviral effects of GSH in combination with acyclovir against BoHV-1 infection in vitro. *Acta Virol.* 60, 328–332. https://doi.org/10.4149/av_2016_03_328

- Zaia, J.A., Levin, M.J., Preblud, S.R., Leszczynski, J., Wright, G.G., Ellis, R.J., Curtis, A.C., Valerio, M.A., LeGore, J., 1983. Evaluation of Varicella-Zoster Immune Globulin: Protection of Immunosuppressed Children after Household Exposure to Varicella. *J Infect Dis* 147, 737–743. <https://doi.org/10.1093/infdis/147.4.737>
- Zalah, L., Huleihel, M., Manor, E., Konson, A., Ford, H., Marquez, V.E., Johns, D.G., Agbaria, R., 2002. Metabolic pathways of N-methanocarbothymidine, a novel antiviral agent, in native and herpes simplex virus type 1 infected Vero cells. *Antiviral research* 55, 63–75.
- Zandi, K., 2016. A Real-Time Cell Analyzing Assay for Identification of Novel Antiviral Compounds against Chikungunya Virus, in: Chu, J.J.H., Ang, S.K. (Eds.), *Chikungunya Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 255–262. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3618-2_23
- Zhao, J., Poelaert, K.C.K., Van Cleemput, J., Nauwynck, H.J., 2017. CCL2 and CCL5 driven attraction of CD172a+ monocytic cells during an equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in equine nasal mucosa and the impact of two migration inhibitors, rosiglitazone (RSG) and quinacrine (QC). *Veterinary Research* 48. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0419-4>
- Zhu, L., Ding, X., Zhang, D., Yuan, C., Wang, J., Ndegwa, E., Zhu, G., 2015. Curcumin inhibits bovine herpesvirus type 1 entry into MDBK cells. *Acta Virol.* 59, 221–227. https://doi.org/10.4149/av_2015_03_221

Chapitre 6 :

ANNEXES

Annexe 1 : Publications scientifiques

Acceptées :

Thieulent C., Hue E., Sutton G., Fortier C., Dallemagne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Paillot R., Vidalain P.-O., Pronost S., 2020. **Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: Efficacy of decitabine and valganciclovir alone or in combination.** Antiviral Research (In Press).

Paillot, R., Sutton, G., Thieulent, C., Marcillaud-Pitel, C., Pronost, S., 2020. **New EHV-1 variant identified.** Veterinary Record 186, 573.

Thieulent C.[§], Hue E.[§], Fortier C., Dallemagne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Fortier G., Pitel P.-H., Vidalain P.-O., Pronost S., 2018. **Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alphaherpesviruses using an impedance-based cellular assay.** Virology 526, 105-116.

Sutton G., Thieulent C., Fortier C., Hue E., Marcillaud-Pitel C., Pléau A., Deslis A., Guitton E., Paillot R.[§], Pronost S.[§], 2020. **Identification of a new equid herpesvirus 1 DNA polymerase (ORF30) genotype with the isolation of a C₂₂₅₄/H₇₅₂ strain in French horses.** Viruses.

En révision ou en cours de rédaction :

Thieulent C., Munier-Lehmann E., Fortier C., Suzanne P., Dallemagne P., Zientara S., Hans A., Paillot R., Vidalain P.-O., Pronost S., Hue E., 2020. **Screening of potential antiviral molecules against equid herpesvirus-1 using cellular impedance measurement: dataset of 2,891 compounds.** Data in Brief (soumis).

Thieulent C., Sutton G., Toquet M.-P., Fremaux S., Hue E., Fortier E., Pléau A., Deslis A., Guitton E., Pronost S., Paillot R., 2020. **Oral administration of valganciclovir reduces clinical signs, virus shedding and cell-associated viremia in ponies experimentally infected with the new variant C₂₂₅₄ of equid herpesvirus-1.** Pathogens (En cours de rédaction).

([§] : Contribution équivalente des auteurs)

Annexe 2 : Congrès internationaux

Communications orales :

2020, Virtual event on infectious diseases, Agilent : Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening. Thieulent C.*, Pronost S.*

2019, European Meeting of Equine Infectious Diseases, Caen, France : Measurement of the neutralisation of equine influenza virus by impedancemetry. Carnet F.*, Sutton G., Thieulent C., Pronost S., Paillot R.

2019, European xCELLigence user meeting, ACEA, Paris, France : ImpedanCELL, une plateforme de mesure de l'activité cellulaire en temps réel et à haut débit en Normandie : exemples d'applications en oncologie et en virologie avec la technologie xCELLigence. Thieulent C.* & Brotin E.

2019, 37th Annual VCRS Symposium, Caen, France : Impedance & other original tools for cellular models. Pronost S.*, Thieulent C., Hue E., Sutton G., Carnet F., Fortier C., Brotin E., Poulain L., Paillot R., Denoyelle C.

2019, European Meeting of Equine Infectious Diseases, Caen, France : Equine herpesvirus 1: phylogenetic analysis in France & new approaches for antiviral therapy. Sutton G.*, Thieulent C.*, Hue E., Fortier C., Paillot R. & Pronost S.

2018, Fourth Havemeyer Equine Herpesvirus Workshop, Beaufort, Caroline du Nord, Etats-Unis : Real-Time monitoring of Equid alphaherpesviruses infectivity in equine dermal cell based on impedance measurements: effects of aciclovir and ganciclovir treatments. Thieulent C., Hue E., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Hans A., Munier-Lehmann H., Fortier G., Pitel PH., Vidalain PO., Pronost S.*

2018, IBCA (Impedance-Based Cellular Assays), Edinburg, Royaume-Uni : Real-Time monitoring of Equid alphaherpesviruses infectivity in equine dermal cell based on impedance

measurements: effects of aciclovir and ganciclovir treatments. Thieulent C.*, Hue E., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Fortier G., Pitel PH., Vidalain PO., Pronost S.

Communications affichées :

2019, 37th Annual VCRS Symposium, Caen, France : Equine herpesvirus 8 and 9: two emerging respiratory viruses in equids. Sutton G., Normand C., Thieulent C., Fortier C., Hue E. *, Mulot B., Leclerc A., Legrand L., Paillot R., Pronost S.

2018, IBCA (Impedance-Based Cellular Assays), Edinburg, Royaume-Uni : Real-Time monitoring of Equid alphaherpesviruses infectivity in equine dermal cell based on impedance measurements: effects of aciclovir and ganciclovir treatments. Thieulent C.*, Hue E., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Fortier G., Pitel PH., Vidalain PO., Pronost S.

*****Prix du meilleur poster*****

2017, ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium, Ghent, Belgique : Impedance monitoring of Equid herpesviruses infectivity in equine dermal cell after acyclovir treatment. Hue E.*, Thieulent C., Fortier C.I, Suzanne P., Zientara S., Hans A., Munier-Lehman H., Vidalain P.O. and Pronost S.

2016, 4th Antiviral Congress, Sitges, Espagne : Real-time monitoring of Equid herpesviruses infectivity in equine dermal cell based on impedance measurements: Effects of acyclovir treatment. Hue E., Thieulent C., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Hans A., Munier-Lehmann H., Fortier G., Pitel PH., Vidalain PO., Pronost S.*

(* : Auteur présentant les travaux)

Annexe 3 : Congrès nationaux

Communications orales :

2020, Journées Sciences et Innovations Equines, Paris : Un nouvel arsenal thérapeutique contre la rhinopneumonie équine. Thieulent C.*, Hue E., Fortier C., Dallemagne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Pitel P-H., Vidalain P.-O. and Pronost S.

2019, XXII^{ème} édition des Journées de l'Ecole Doctorale NBISE 497, Caen : Real-time monitoring of alphaherpesviruses infectivity in equine dermal cell based on impedance measurements : effect of aciclovir and ganciclovir treatment. Thieulent C.*, Hue E., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Pitel P-H., Vidalain P.-O. and Pronost S.

2019, XIII^{ème} journées du Réseau HERPAS, Lyon : Criblage et évaluation de l'effet de molécules antivirales contre les herpèsvirus équins 1 et 4 par mesure d'impédance cellulaire : effet de la spironolactone. Thieulent C.*, Hue E., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Pitel P-H., Vidalain P.-O. and Pronost S.

2019, XIII^{ème} journées du Réseau HERPAS, Lyon : Les herpèsvirus équins 8 et 9 : quels risques représentent ces deux virus émergents pour la santé équine ? Sutton G.*, Thieulent C., Fortier C., Mulot B., Leclerc A., Legrand L., Paillot R., Pronost S.

2019, Journées Sciences et Innovations Equines, Saumur : Le ganciclovir, pour traiter la rhinopneumonie demain ? Thieulent C.*, Hue E., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Pitel P-H., Vidalain P.-O. and Pronost S.

2018, 3^{ème} journée des doctorants de la filière équine, Paris : Stratégie antivirale contre l'herpèsvirus équin-1. Thieulent C.*

2018, 46^{ème} journées annuelles de l'Association Vétérinaire Equine Française (AVEF), Bordeaux : Effets de l'aciclovir et du ganciclovir contre les herpèsvirus équins : Suivi en temps réel par impédancemétrie. Thieulent C., Hue E., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Pitel P-H., Vidalain P.-O. and Pronost S.*

Communications affichées:

2019, XXI^{ème} Journées Francophones de Virologie, Lyon : Criblage et évaluation de l'effet de molécules antivirales contre les herpèsvirus équins 1 et 4 par mesure d'impédance cellulaire : effet de la spironolactone. Thieulent C.*, Hue E., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Pitel P-H., Vidalain P.-O. and Pronost S.

2019, Journées Sciences et Innovations Equines, Saumur : Le ganciclovir, pour traiter la rhinopneumonie demain ? Thieulent C.*, Hue E., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Munier-Lehmann H., Hans A., Pitel P-H., Vidalain P.-O. and Pronost S.

2018, 46^{ème} journées annuelles de l'Association Vétérinaire Equine Française (AVEF), Bordeaux : Confirmation d'infections mortelles par HVE-9 chez des zèbres de Grévy en captivité. Gabrielle Sutton*, Côme Thieulent, Christine Fortier, Baptiste Mulot, Romain Paillot, Loïc Legrand, Antoine Leclerc, Stéphane Pronost.

2017, XI^{ème} Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris : Suivi en temps réel par impédancemétrie de l'infection des cellules dermiques équines par les herpèsvirus équins : effet de l'acyclovir. Hue E.*, Thieulent C., Fortier C., Suzanne P., Zientara S., Hans A., Munier-Lehmann H., Vidalain P-O., Pronost S.

(* : Auteur présentant les travaux)

Annexe 4 : 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 (*in press*)

Article

Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a impact on the strain behaviour

Gabrielle Sutton ^{1,2}, Côme Thieulent ^{1,2}, Christine Fortier ^{1,2,3}, Erika S. Hue ^{1,2,3}, Christel Marcillaud-Pitel ⁴, Alexis Pléau ⁵, Alain Deslis ⁵, Edouard Guitton ⁵, Romain Paillot ^{1,2} [†] and Stéphane Pronost ^{1,2,3} [†]

¹LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France. gabrielle.sutton@laboratoire-labeo.fr (G.S.); come.thieulent@laboratoire-labeo.fr (C.T.); christine.fortier@laboratoire-labeo.fr (C.F.); erika.hue@laboratoire-labeo.fr (E.H); romain.paillot@laboratoire-labeo.fr (R.P.); stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr (S.P.)

²Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France.

³Normandie Univ, UNICAEN, ImpedanCELL, 14280 Saint-Contest, France.

⁴RESPE, 14280 Saint-Contest, France. c.marcillaud-pitel@respe.net (C.M-P.)⁵INRAE, UE-1277 Plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE), Centre de Recherche Val de Loire, 37380 Nouzilly, France. alexis.pleau@inrae.fr (A.P.), alain.deslis@inrae.fr (A.D.), edouard.guitton@inrae.fr (E.G.)

[†]The authors have contributed equally to the work.

* Correspondence:Correspondence: stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr; Tel.: +33 2 31 47 19 19

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Equid herpesvirus 1 is one of the most frequent viral pathogens in the horse population and is associated with respiratory disease, abortion and still-birth, neonatal death or neurological disease. A single point mutation in the DNA polymerase gene (ORF30: A2254G, N752D) has widely been associated with neuropathogenicity of strains although this association was not exclusive. This study describes the fortuitous isolation of a strain carrying a new genotype C₂₂₅₄ (H₇₅₂) from an outbreak in France that lasted several weeks in 2018 and involved 82 horses, two of which showed neurological signs of disease. The strain was characterised as U_L clade 10 using EHV-1 Multi Locus Sequence Typing (MLST) classification but was not identified or isolated since 2018. The retrospective screening of EHV-1 strains collected between 2016 and 2018 did not reveal the presence of the C₂₂₅₄ mutation. When cultured *in vitro*, the C₂₂₅₄ EHV-1 strain induced typical EHV-1 syncytium and cytopathic effect but no significant difference was observed when compared with A₂₂₅₄ and G₂₂₅₄ EHV-1 strains. An experimental infection was carried out on 4 Welsh mountain ponies to confirm the infectious nature of the C₂₂₅₄ strain. A rapid onset of marked respiratory disease lasting at least 2 weeks, with significant virus shedding and cell-associated viraemia was observed. Finally, *in vitro* antiviral assay using impedance measurement and viral load quantification was performed with three antiviral molecules (ganciclovir (GCV), aciclovir (ACV) and aphidicolin (APD)) on the newly isolated C₂₂₅₄ strain and two other A/G₂₂₅₄ field strains. The three strains showed similar sensitivity to ganciclovir and aphidicolin but both C₂₂₅₄ and A₂₂₅₄ strains were more sensitive to aciclovir than G₂₂₅₄ strain, using viral load measurement.

Keywords: equid herpesvirus 1; DNA polymerase; ORF30; EHV-1; antivirals; experimental infection

1. Introduction

The equid herpesvirus 1 (EHV-1) is an Alphaherpesvirus classified among the *Herpesviridae* family and the *Varicellovirus* genus [1]. EHV-1 is one of the most important viral pathogens infecting horses. Some cases were also reported in other equid and non-equid mammals [2,3].

Transmission of the EHV-1 occurs through direct contacts between horses, inhalation of infectious aerosols, direct contacts with infected fomites, placenta and aborted foetus, or indirect contacts with humans. EHV-1 first infects and replicates in the epithelial cells of the upper respiratory tract [4,5]. At this stage of EHV-1 infection, horses may present a respiratory form of disease associated with nasal discharge, cough and pyrexia. EHV-1 quickly translocates to the draining lymph nodes and associated lymphoid tissues where it infects leucocytes [6]. Circulation of infected leucocytes during cell-associated viraemia disseminates EHV-1 through the organism, to secondary sites such as the central nervous system or the reproductive tract. In these cases, EHV-1 can induce equine herpesvirus encephalomyelitis (EHM; from a mild limb ataxia to quadriplegia) or abortion, stillbirth and neonatal death [7–10]. Finally, like all herpesviruses, EHV-1 has the ability to establish latency after primo-infection and to reactivate under environmental stress conditions, immune weakness or after corticoid-based treatments [11–15].

EHV-1 genome is 150 kbp and carries 76 ORFs encoding for proteins involved at different stages of the viral replication cycle. Among them, the 3663 kb long open reading frame 30 (ORF30) encodes for the DNA polymerase [16]. The mechanisms conditioning one type of disease from another are not well-known but a correlation between a non-synonymous mutation in position 2254 of the ORF30 and the pathogenicity of EHV-1 strains was presented in 2006 by Nugent *et al.* [17]. Strains carrying a guanine (G) in position 2254 (aspartic acid (D) in position 752 of the protein), were identified as neuropathogenic, while those carrying an adenine (A) in the same position (asparagine (N752)) were identified as non-neuropathogenic [17–19]. Several studies based on field isolates since suggested that abortion is largely associated with A₂₂₅₄ EHV-1 strains, while in the case of EHM, the genotype/pathotype association is less obvious [20–22]. It has been described that G₂₂₅₄ EHV-1 strains replicate more efficiently in the horse and produce significantly higher viral loads [23].

Due to the diseases it causes, EHV-1 has a significant impact on the equine health and industry. As a preventive strategy, thorough vaccination against EHV-1 reduces the intensity of the clinical signs, virus shedding and therefore the extent of an outbreak [24]. It is generally accepted that implementation of EHV-1 vaccination in the late 1960s alongside biosafety measures and herd management have reduced the abortion storm occurrence [10]. To date, no claim exists against the EHM for the various vaccines against EHV-1, possibly due to the difficulty to experimentally reproduce this form of disease [20,25,26]. Concerning the therapeutic strategy, no EHV-1 specific treatment is commercialised. However, some studies have shown the *in vitro* efficacy of antiviral compounds such as ganciclovir (GCV) and aciclovir (ACV) [27,28]. The ORF30 position 2254 mutation has no effect on these molecules efficacy *in vitro* but has been shown to modify EHV-1 sensitivity to aphidicolin (APD) *in vitro*. Indeed, APD had a better antiviral effect against A₂₂₅₄ (N752) EHV-1 strains than G₂₂₅₄ (D752) EHV-1 strains [18]. However, *in vivo* experimental infections showed heterogeneous data after aciclovir treatment [28,29].

This study describes a new ORF30 genetic profile, with the identification of a strain carrying a cytosine (C) in position 2254 resulting in a histidine (H) in the amino acid position 752. The strain was isolated at several occasions over 6 months in 2018 from one single and localised EHV-1 outbreak and during which 82 vaccinated horses were affected and showed clinical signs of respiratory diseases, associated with hyperthermia and hind limbs oedema [30]. Two horses showed neurological signs of disease and one of them was euthanised. Virus isolation, complete ORF30 sequencing and multi locus sequence typing (MLST) allowed the identification of an U_L clade 10 EHV-1 strain. A new PCR genotyping test was developed to identify specifically the C₂₂₅₄ strain. Experimental infection on four Welsh mountain ponies confirmed the infectious nature of the newly isolated strain. *In vitro* antiviral assays using Real-Time Cell Analysis (RTCA) technology ([27]) against the newly isolated strain and two other A/G₂₂₅₄ field strains showed that these three strains had good sensitivity to GCV, ACV and APD.

2. Materials and Methods

2.1. Samples collection and EHV-1 strains

160 samples related to EHV-1 outbreaks were collected between 2016 and 2020 from the diagnostic and equine research Institute LABÉO (Saint-Contest, France), the French Epidemiological Surveillance Network for Equine Pathology (Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en Pathologie Equine (RESPE), Saint-Contest, France) and associated equine veterinary practitioners (109 nasal swabs or tracheal washes, 6 spinal cord, brain or cerebrospinal fluid samples, 36 liver, lung or placenta samples, and 9 blood samples) (Supplementary Table S1). These data included samples collected from 21 horses housed at the same premises during an EHV-1 outbreak that occurred between March and November 2018. During this outbreak, nasal swabs were taken from 9 horses (Horses 1 to 9) at the onset of clinical signs of respiratory disease. Nasal swabs, heparinised blood and serum samples were taken from 12 horses at the same time (Horses 10 to 21). Serum samples were also collected 14 days later from 11 out of these 12 horses (Horses 10 to 20).

Two other EHV-1 strains, FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) and FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂), collected at LABÉO in 2013 and 2009 respectively, were also used in this study for antiviral assay [27].

2.2. Nucleic acids extraction

Nasal swabs were sampled in 4 mL Eagle Minimal Essential Medium complemented with 1% antibiotics (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin, reference: CABPSA00-0U, Eurobio, Courtaboeuf, France) or phosphate-buffered saline (PBS). Nucleic acids from nasal swabs and from culture supernatant for the antiviral assay were extracted using QIAmp® Viral RNA Mini Kit extraction kits (Qiagen, Hilden, Germany) as manufacturer's recommendations.

2.3. PCR assays

Detection/quantitative PCR (PCR 1): A quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) assay was performed on purified nucleic acids for EHV-1 glycoprotein B (gB) gene detection and quantification using Diallo *et al.* (2006) primers and probe. All qPCR details are summarised in Supplementary Table S2 [31]. TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for this assay. A standard curve based on a cloned sequence was used for the calculation of the number of copies per sample as described previously [27,32].

Typing PCR (PCR 2): A second real time PCR assay was performed using Allen *et al.* (2007) primers and probes for the ORF30 A/G₂₂₅₄ typing [33]. TaqMan Universal Master Mix was also used for this PCR and all details are summarised in Supplementary Table S2.

A new PCR (PCR 3) assay was designed with a specific probe for the detection of a cytosine at the ORF30 2254 position (Table 2).

2.4. Sequencing assay, MLST, phylogenetic analysis and 3D modelisation

ORF30 position 2254 sequencing was performed using Allen *et al.* (2007) PCR primers (Supplementary Table S2). Amplification PCR (PCR 4) was performed using Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/μL) chemistry (ThermoFisher Scientific). Amplicons were purified using QIAquick PCR Purification Kit® (Qiagen). Sequencing PCR (PCR 5) was performed using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific). All details are described in Supplementary Table S2. Sequencing products were purified using ZR DNA Sequencing Clean-Up® Kit (Zymo Research, CA, USA) and electrophoresis was performed using the 3500 Genetic Analyser® (ThermoFisher Scientific). Complete ORF30 sequencing was performed by BIOFIDAL (Vaulx-en-Velin, France), as previously described [22] (Supplementary Table and Figure S3). Sequences were analysed using BioEdit version 7.0.5.3 (Tom Hall, Carlsbad, CA, US) [34]. A median joining network based on ORF30 was built using Population Analysis with Reticulate Trees (PopART) software (Jessica Leigh, David Bryant and Mike Steel, Dunedin, New Zealand) [35].

The MLST analysis was performed as previously described [22,36]. Sequences were also analysed using BioEdit, and a Neighbour joining Network was built using Splitstree 4 [37].

DNA polymerase three dimensional models were built using Phyre2 and Phyre2 Investigator web servers and based on the new C₂₂₅₄ EHV-1 strain (identified as FR-56628 in section 3.3 (accession number: MT968035)) and EHV-1 reference strains Ab4 (AY665713) and V592 (AY464052) ORF30 amino acid sequence homologies with Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1, also identified as Human Herpesvirus 1 (HHV-1)) [38].

2.5. Cell culture and virus culture and titration

The cell lines from RK13 (rabbit kidney cells, ATCC®, Molsheim, France), EEK (equine embryonic kidney cells, kindly provided by Merial, Lyon, France) and E.Derm (equine dermal fibroblasts, ATCC®) were used in this study. All the cell lines were cultured at 37°C with 5% CO₂. RK13 cells were maintained in Minimum Essential Medium (MEM) with Earle's salts (reference: CM1MEM10-01, Eurobio) complemented with 1% L-glutamine (reference: CSTGLY00-0U Eurobio). EEK were maintained using MEM Alpha (reference: L0476-500, Biowest, Nuaille, France) complemented with 2% Lactalbumine 50X (reference 58901C, Sigma-Aldrich, MO, USA), 1% L-glutamine and 0.2% D-glucose 45% (reference G8769, Sigma-Aldrich). E.Derm cells were maintained in ATCC® 30-2003 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC®). All media were also complemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, reference: CVFSVF00-01, Eurobio) and 1% antibiotics (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin, Eurobio).

Peripheral blood mononucleated cells (PBMC) were isolated from heparinised blood samples using Hue *et al.* method [39] and co-cultured with RK13 cells monolayer for up to 6 days. Nasal swabs were sampled in 4 mL from which 500µL were inoculated on E.Derm and RK13 cells, and cultured for up to 7 days. Co-culture was monitored using IncuCyte® Live Cell Analysis technology (Essen BioScience, MI, USA). The newly isolated EHV-1 strain (FR-56628) was amplified on both E.Derm and RK13 cells. Second passage virus titer was determined on RK13, E.Derm and EEK cells lines using the Karber method [40].

EEK cells were inoculated (1.2×10^4 cells per well) in three 96 wells plates for xCELLigence acquisition (E-plate VIEW 96 PET, ACEA Biosciences, CA, USA), IncuCyte® acquisition and viral load quantification, respectively. Cells were cultured for 24 hours prior to infection with four EHV-1 strains (the newly isolated C₂₂₅₄ EHV-1 strain, two strains FR-6815 (A₂₂₅₄) and FR-38991 (G₂₂₅₄) isolated from the field, and the reference EHV-1 strain KyD (VR700™, ATCC®) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.05. The time corresponding to 50% of the cell index decrease (CIT₅₀) was measured [41].

2.6. Neutralisation assay

A neutralisation assay was performed following the World Organisation for Animal Health (OIE) method. E.Derm cells (1.2×10^4 cells per well) and the EHV-1 KyD strain (VR-700™, ATCC®) were used for this assay [42].

2.7. Experimental infection with EHV-1, clinical signs of diseases, virus shedding and cell-associated viraemia

Four 10-month old male Welsh mountain ponies, seronegative for EHV-1 and EHV-4 (confirmed by seroneutralisation (SN) and complement fixing (CF) assays) and with no history of EHV infection (EHV-1 PCR was negative 3 days before infection), were experimentally infected by individual nebulisation (Flexineb® nebuliser; VLC Europe, Bazoches sur Guyonne, France) [43] with the C₂₂₅₄ EHV-1 strain (third passage on RK13 cells; 2 mL dose per pony containing a total of 5.10^7 tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀)). The day of experimental infection was defined as Day 0.

All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council, in the facilities of the EU-1277 Plateforme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE, INRAE, 2018. Infectiology of farm, model and wild animals facility, [44], Centre Val de Loire, Nouzilly, France). All experimental procedures were approved by the Loire Valley ethical review board (CEEA VdL, committee number 19).

Rectal temperature (RT) was recorded twice a day from Day -5 to Day+ 21 post infection (pi). Pyrexia was defined as a rectal temperature exceeding 38.8°C. Clinical scores were recorded twice a day from Day -5 to Day +21 for cough, attitude, nasal discharge, ocular discharge, mandibular lymph nodes enlargement, ataxia and other signs of neurological disease. The cumulative clinical score after experimental infection with EHV-1 was calculated using the score for each clinical sign according to the formula used and reported previously for equine influenza virus infection in Welsh mountain ponies with some minor modifications [45]:

Cumulative clinical score = score RT + score nasal discharge + 2*(score cough) + score lymph node enlargement + score ocular discharge.

Nasopharyngeal swabs were collected on Day -3, from Day +1 to Day +10 and on Days +12, +14, +16, +18, +20 and +21. The swabs were placed directly into 3 mL of EMEM + 1% antibiotics. Virus DNA extraction was performed from nasopharyngeal swab extracts to measure virus shedding using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen) and according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed as described in section 2.3. Blood samples were collected by jugular venepuncture into EDTA and dry tubes each day from Day 0 to Day +21. Virus DNA extraction from 2 mL of EDTA blood was performed to determine cell-associated viremia using the Nucleospin® Blood L kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR (PCR 1) was performed as described in section 2.3.

2.8. *In vitro* antiviral assay

Antiviral assay was performed using xCELLigence Real-Time Cell Analysis (ACEA, Bioscience) and Incucyte® technologies. Cells were infected with three EHV-1 strains (the newly isolated C₂₂₅₄ EHV-1 strain (FR-56628), and two EHV-1 strains FR-6815 (A₂₂₅₄) and FR-38991 (G₂₂₅₄) isolated from the field) as described in section 2.5 and treated simultaneously with three antiviral drugs in dose response manner as presented in Table 1. All compounds were previously dissolved at 20 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C. One plate was frozen 48 hours post-infection (hpi) for viral load quantification. From this plate, nucleic acids were extracted as described in section 2.2, and viral load was quantified as described in section 2.3. The two other plates were kept in culture for up to 140 hpi. Infected or non-infected cells treated with 0.5% DMSO were used in each plate as control. The half maximal effective concentration (EC₅₀) was calculated as previously described [27]. Experiments were carried out at least three times.

Table 1. Antiviral molecules tested against the newly isolated EHV-1 strain (FR-56628) and EHV-1 strains FR-6815 and FR-38991.

Antiviral molecule name	Abbreviation	Empirical formula	DNA polymerase inhibitor	Initial concentration	Final concentration	Dilution fold	Replicates
Ganciclovir	GCV	C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄	Nucleoside analogue ¹	50 µM	0.10 µM	2	3
Aciclovir	ACV	C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃	Nucleoside analogue ²	100µM	0.78 µM	2	3
Aphidicolin	ADP	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	Nucleoside-binding site homology ³	2.5µM	0.02 µM	2	4

¹ Elion *et al.* 1983 [46], ² Matthews and Boehme 1988 [47], ³ Sheaff *et al.* 1991 [48].

2.9. Statistical analysis

For the antiviral assay results, statistical analysis was performed on StatGraphics® Centurion XVI Version 16.1.12 for windows (StatPoint Technologies, Inc, Warrenton, VA, USA) [49]. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare CIT₅₀. EC₅₀ were compared using a Tukey's multiple comparison test. Data were considered significant for P value <0.05.

3. Results

3.1. EHV-1 outbreak description

In 2018, 82 horses located in a single site in France and kept in different stable blocks showed clinical signs of disease associated with EHV-1 infection (i.e. cough, nasal discharge, anorexia, pyrexia, depression and limb oedema) over a 6 months period, from March 2018 to November 2018. The origin of this specific outbreak is unknown.

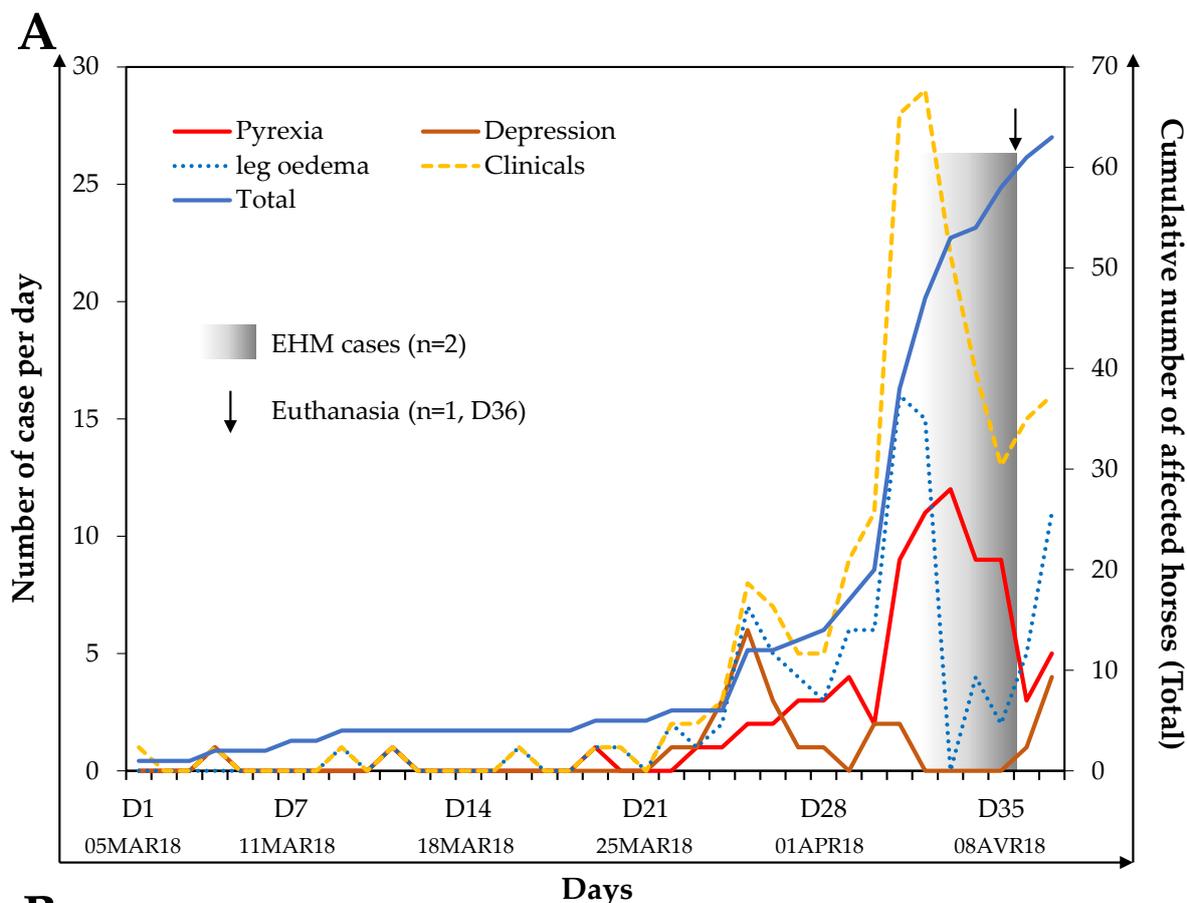
Due to the increased number of EHV infection cases reported to RESPE in February and March 2018 (12 outbreaks between the 1st of January 2018 and the 31st of March 2018), and rapidly after the first clinical signs appeared in a first stable block (5th of March), the 64 horses kept in this stable block were monitored for a set of clinical signs of respiratory disease (e.g. cough, nasal discharge, anorexia, defined as “respiratory signs” in this report), temperature, depression and limb oedema from the 5th of March 2018 to the 22nd of April 2018. There are no data available for the first block after this date.

As illustrated in Figure 1A, an increased frequency of clinical signs of disease was observed around 22 days (26th of March 2018) after the first clinical signs were reported in this group. 63 horses out of 64 showed clinical signs of disease during the monitoring period. The available data showed first peak on the 25th day (29th of March 2018) after the beginning of the monitoring and was followed by a second and major peak on 33rd day (6th of April 2018). Overall, 62 (96.9%) horses displayed respiratory signs for a duration ranging from 1 to 13 days (average: 3.2 ± 2.4 days), 45 (70.3%) horses showed pyrexia ($>38.8^\circ\text{C}$) during 1 to 7 days (average: 1.8 ± 1.4 days), 38 (59.4%) horses showed limb oedema during 1 to 6 days (average: 2.5 ± 1.5 days) and finally 18 (28.1%) horses presented signs of depression during 1 to 4 days (average: 1.5 ± 1 days) (Figure 1B).

The clinical picture was variable from horse to horse as shown in Figure 1B. Clinical signs appearing alone or in combination, the most represented combinations being respiratory signs + pyrexia + leg oedema + depression (29.7%), respiratory signs + pyrexia (20.3%) and respiratory signs + pyrexia + leg oedema (14.1%).

Amongst this population, two horses showed neurological signs of disease (9th of April 2018), which required euthanasia for one of them. There is no information available concerning treatments administered during the outbreak, or concerning the clinical signs evolution after the 22nd of April 2018.

During this period, nasal swabs were taken from four horses from the first stable block (Horses 1 to 4) and tested positive for EHV-1 using PCR 1 assay (5th of April 2018). Right after this first episode, three other horses from a second stable block in the premises (Horses 5 to 7) were sampled and also tested positive for EHV-1 using the same PCR assay (19th and 26th of April 2018). Finally, a new episode was reported from October to November 2018, during which 14 horses from a third stable block in the premises (Horses 8 to 21) were sampled and 11 of them tested positive for EHV-1 using PCR 1 assay (samples from Horses 12, 15 and 20 were negative; Supplementary Table S4).



B

Signs of disease	n	%	Combined signs of disease	n out of 64	%
Respiratory Signs (R)	62	96.9	R + P + L + D	19	29.7
			R + P	13	20.3
			R + P + L	9	14.1
			R	7	10.9
Pyrexia (P)	45	70.3	R + L	6	9.4
Leg oedema (L)	38	59.4	R + P + D	4	6.3
			R + L + D	3	4.7
Depression (D)	18	28.1	R + D	1	1.6
			L	1	1.6
			None	1	1.6

Figure 1. Clinical signs monitored from the 5th of March 2018 to the 22nd of April 2018 in a group of 64 horses from a single stable block in the premises (A). The left axis represents the number of cases per day with pyrexia, depression, leg oedema or general clinical signs; the right axis represents the total of horses affected each day (blue line). Frequency of horses showing a sign of disease, alone or in combination, is presented in (B).

3.2. New (ORF30) C₂₂₅₄ mutation identification

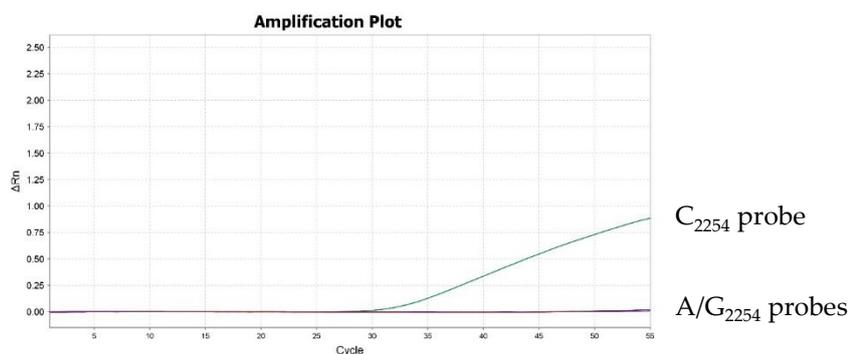
As described above, EHV-1 was detected in 18 nasal swab samples out of 21, all taken from different horses from the premises described previously,, using a detection PCR assay (PCR 1) that amplifies a 63bp fragment of EHV-1 gB gene (Supplementary Table S4). As the A/G typing of the ORF30 mutation in position 2254 (PCR 2) was unsuccessful, 145 bp ORF30 fragments from Horses 2, 6 and 7 samples were sequenced, which revealed a cytosine at position 2254.

In order to identify new C₂₂₅₄ strains using a PCR assay (PCR 3), a modified MGB probe was designed based on Allen *et al.* (2007) existing probes sequences (Table 2). While A₂₂₅₄ and G₂₂₅₄ probes were used in a multiplex PCR (PCR 2), C₂₂₅₄ probe was used in a simplex PCR (PCR 3) and amplification curves are shown in Figure 2. The specificity of the C₂₂₅₄ probe was validated with the EHV-1 isolates FR-6815 (A₂₂₅₄) and FR-38991 (G₂₂₅₄) and 160 DNA EHV-1 positive field samples (including the 21 samples collected in this study) obtained from different biological matrices and collected between 2016 and 2018 (Supplementary Table S1). 17 of the 18 EHV-1 positive (PCR 1) nasal swabs collected in 2018 from the premises described in section 3.1, were tested and confirmed to contain C₂₂₅₄ EHV-1 strains only. These samples were the only to contain the C₂₂₅₄ subtype. No further samples from these premises was available (in 2019 and 2020). 30 out of the 160 EHV-1 positive samples could not be typed due to low EHV-1 viral load. 56 samples contained the A₂₂₅₄ subtype and 57 samples contained the G₂₂₅₄ subtype.

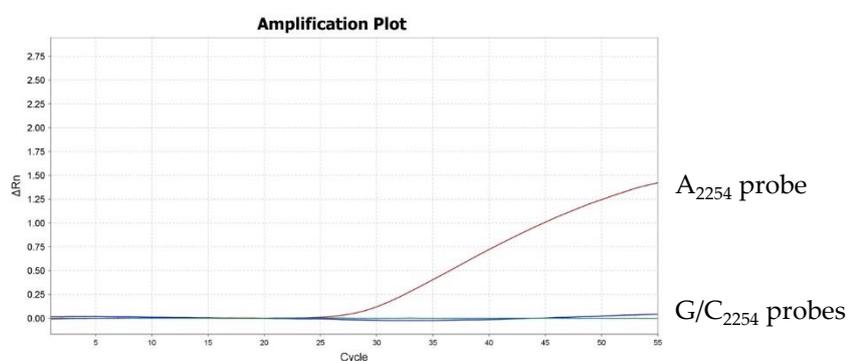
Table 2. PCR conditions of the newly developed assay (PCR 3) for C₂₂₅₄ strain detection.

Primers and probe	Sequence
Primer - GaF	5'-CCACCCTGGCGCTCG-3'
Primer - GaR	5'-AGCCAGTCGCGCAGCAAGATG-3'
Probe - C ₂₂₅₄	5'- NED-CATCCGTCCACTACTC-MGB-NFQ-3'
Thermoprofile	95°C during 10 minutes, 55 cycles x {95°C during 15 seconds, 65°C during 1 minute} - QuantStudio™ 12K Flex Real-time PCR System
Mixture for 1 sample	2,5µL DNA extract + 12.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix + 0,6 µL of each primer (20µM) + 0.5µL of 10µM probe (depending on titration) + nuclease free water to complete to 25µL

A C₂₂₅₄ probe amplification curve on EHV-1 strain isolated from Horse 9



B A₂₂₅₄ probe amplification curve on EHV-1 strain FR-6815



C G₂₂₅₄ probe amplification curve on EHV-1 strain FR-38991

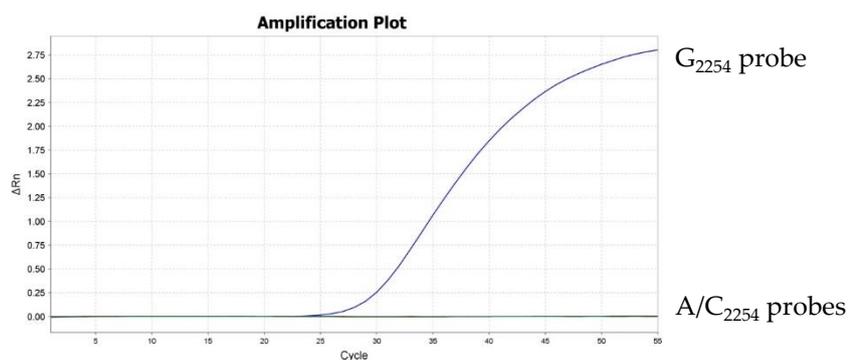


Figure 2. Real-time PCR amplification curves using C₂₂₅₄ probe (green curve) and both A₂₂₅₄ (red curve) and G₂₂₅₄ (blue curve) probes on a 145 bp fragment of the ORF30 for the typing of an EHV-1 positive sample from the premises described in section 3.1 (C₂₂₅₄) (A), EHV-1 strains FR-6815 (A₂₂₅₄) (B) and FR-38991 (G₂₂₅₄) (C). Simplex amplification curve (C₂₂₅₄) and multiplex amplification curves (A/G₂₂₅₄) are combined on each graph.

3.3. Virus isolation

Virus isolation from 3 nasal swabs (Horses 2, 6 and 7) was attempted without success. Consequently, PBMC were isolated from heparinised blood taken from six other horses (Horses 10 to 15) and co-cultured on RK13 cells. Cytopathic effects (CPEs) characterised by syncytia formation were observed for two samples (from Horses 10 and 13) after 1 and 4 days of incubation, respectively (Figure 3A). The new C₂₂₅₄ probe (PCR

3) confirmed the presence of C₂₂₅₄ EHV-1 in the culture supernatants collected after 5 days (Horse 13) and 6 days (Horse 10) of incubation (Figure 3B). The strain isolated from Horse 13 was identified as FR-56628 (MT968035). Virus isolation on E.Derm cells monolayer from a nasal swab collected from Horse 13, at the same time, was also successful. The presence of mucosal neutralising antibodies was investigated in five nasal swabs (when sample quantity allowed it) isolated from Horses 16 to 19 and from Horse 21 in a neutralisation assay using the EHV-1 strain. No neutralisation was measured (data not shown). *In vitro* growth of the strain FR-56628 (C₂₂₅₄) on EEK cells was compared to three other EHV-1 strains FR-6815 (A₂₂₅₄), FR-38991 (G₂₂₅₄) and reference strain KyD VR700™ (G₂₂₅₄), showing a similar decrease of the cell index for the four strains (Figure 3C). The viral load was measured and calculated in Log₁₀ for each strain 48 hours post-infection (hpi) on EEK cells (MOI of 0.05) (Supplementary Table S5). There was no significant variation ($p = 0.77$) of viral load 48 hpi between the EHV-1 strains FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂), FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) and FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) and KyD VR700™. The viral load values in Log₁₀ for each strain are as follows: 8.99±0.46 (FR-56628); 9.21±0.20 (FR-6815); 9.14±0.18 (FR-38991); 9.04±0.07 (KyD VR700™). However, there was a significant difference in the CIT₅₀ mean±standard between the EHV-1 strains FR-6815 and the EHV-1 strains FR-38991 and FR-56628 ($p = 0.033$). The CIT₅₀ values for each strain are as follows: 1.11± 0.10 (FR-56628); 1.00± 0.06 (FR-6815); 1.12± 0.13 (FR-38991); 1.00± 0.05 (KyD VR700™).

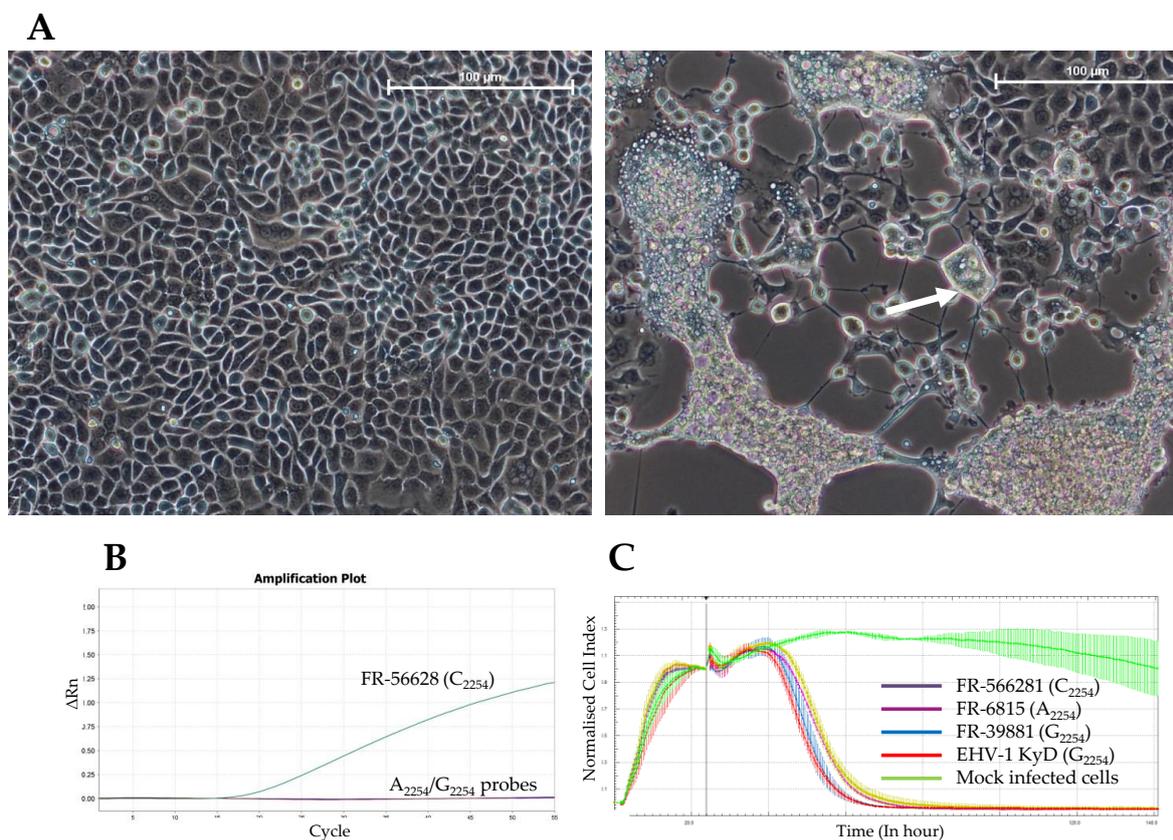


Figure 3. Microscopic observation of RK13 cells monolayer without (left) or with infection with the EHV-1 strain FR-56628 (120 hpi; right). Microscope lens: x20. Scale bar: 100µm. White arrow indicates an example of syncytia formation (A). Amplification curves for the EHV-1 strain FR-56628 detected with the C₂₂₅₄ probe (B). Real-Time Cell Analysis of EEK cells infected with EHV-1 strains FR-56628 (C₂₂₅₄; yellow curve), FR-6815 (A₂₂₅₄; purple curve), FR38991 (G₂₂₅₄; blue curve), and reference strain KyD VR700™ (G₂₂₅₄; red curve) at a MOI of 0.05, in comparison with mock infected cells (green curve) (C).

3.4. Phylogeny

The full ORF30 sequence was obtained from the newly isolated EHV-1 strain FR-56628, and compared with ORF30 from the EHV-1 reference strains Ab4 and V592. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified between EHV-1 strains FR-56628 and Ab4 (positions 96, 2254 and 2968) and also three SNPs were identified between EHV-1 strains FR-56628 and V592 (positions 96, 924 and 2254) as shown in Figure 4 (complete ORF30 alignment in Supplementary Figures S5 and S6). The 2254 and 2968 SNPs are non-synonymous (D752H or N752H and E990K, respectively).

(a)	90-----100	920-----930	2250-----2260	2960-----2970
Ab4 (AY665713)	CGGGCAGACCG	GTTTCGGGTGGTA	CGTCGACTACT	CGGCAGCAGAG
FR-56628A.....C.....A..
V592 (KC924819)T.....A.....A..
(b)	740-----750-----760	980-----990-----1000		
Ab4 (AY665713)	DEVDLAGLQPSVDYSTFEVGD	YDEDVATAAAEVTDVPPAEWV		
FR-56628H.....K.....		
V592 (KC924819)N.....K.....		

Figure 4. ORF30 nucleotide (A) and amino acid (B) sequence alignments between the EHV-1 reference strains Ab4, V592 and the newly isolated strain FR-56628.

Three dimensional models of the DNA polymerase were obtained based on the homology of the ORF30 amino acid sequences from EHV-1 strains Ab4 (G₂₂₅₄), V592 (A₂₂₅₄) and FR-56628 (C₂₂₅₄) with Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) (Figure 5). The amino acid residue in position 752 is located in the palm domain and remains close to the fingers domain. After analysis of the sequence by Phyre2 Investigator, the web server predicted that this residue change was unlikely to affect the protein function (data not shown).

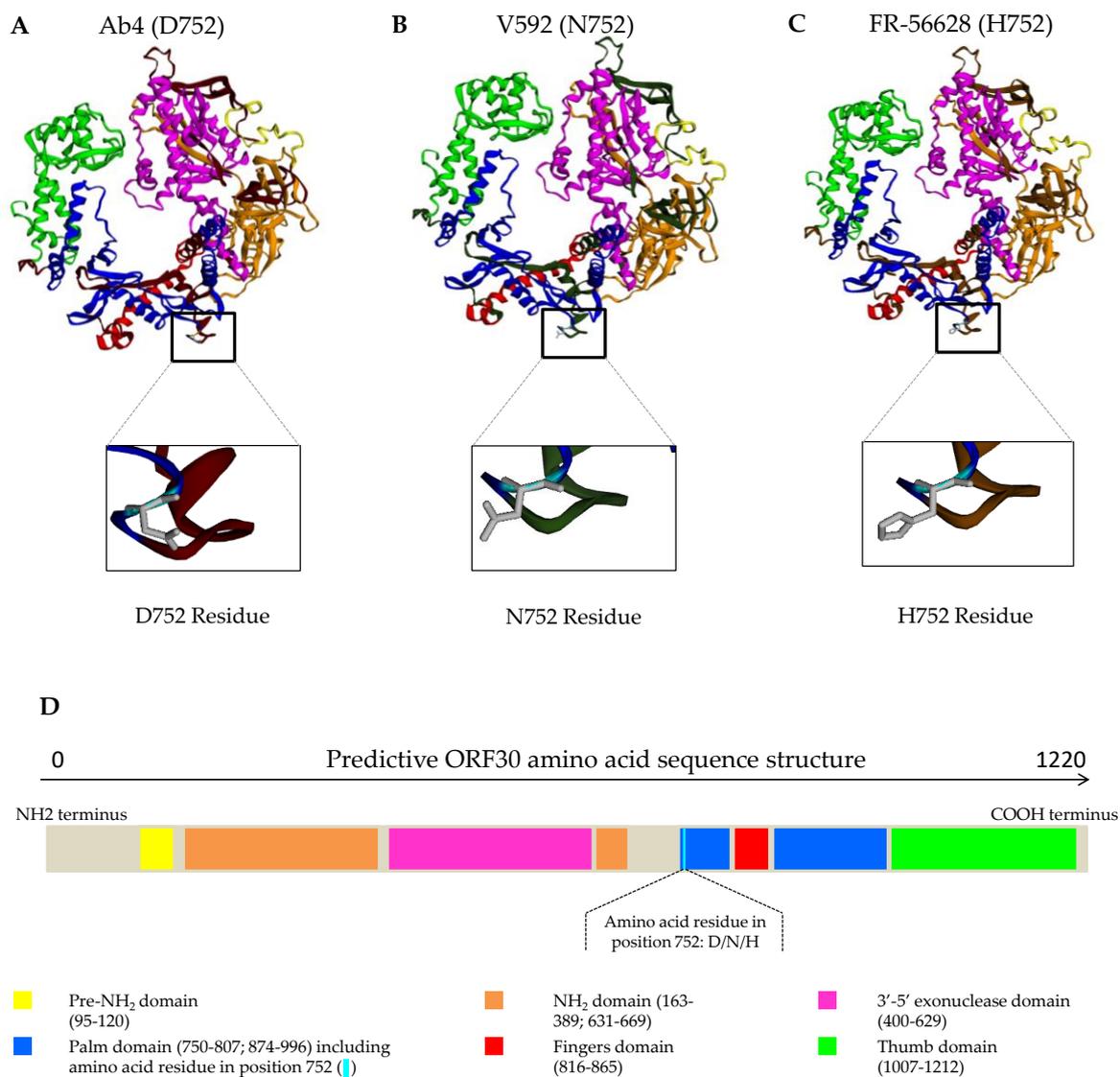


Figure 5. Three dimensional models of EHV-1 strains Ab4 (D₇₅₂) (A), V592 (N₇₅₂) (B) and the newly isolated EHV-1 strain FR-56628 (H₇₅₂) (C) ORF30 amino acid sequences based on their homology with HSV-1 DNA polymerase and predictive structure of the ORF30 amino acid sequence (D).

The complete ORF30 gene sequence was compared with previously published sequences from 14 EHV-1 strains from France and Belgium, 67 EHV-1 strains mostly from the United Kingdom and reference strains Ab4 and V592 (Figure 6) [22,50]. As previously described, the ORF30 Median Joining Network discriminates these strains in two groups, the second one being a group of three clusters. The EHV-1 strain FR-56628 is located in cluster 2 with one French strain isolated in 2010, three other French strains isolated between 2015 and 2018, a Belgium strain isolated in 2017 and six strains from the UK isolated between 1993 and 2013 (ORF30 Maximum Likelihood Tree in Supplementary Figure S7). The EHV-1 strain FR-56628 showed 1 to 4 nucleotide differences when compared with the other EHV-1 strains from cluster 2 (including the mutation in position 2254), and from 1 to 5 nucleotide differences when compared with all 83 EHV-1 strains of the network (including the mutation in position 2254).

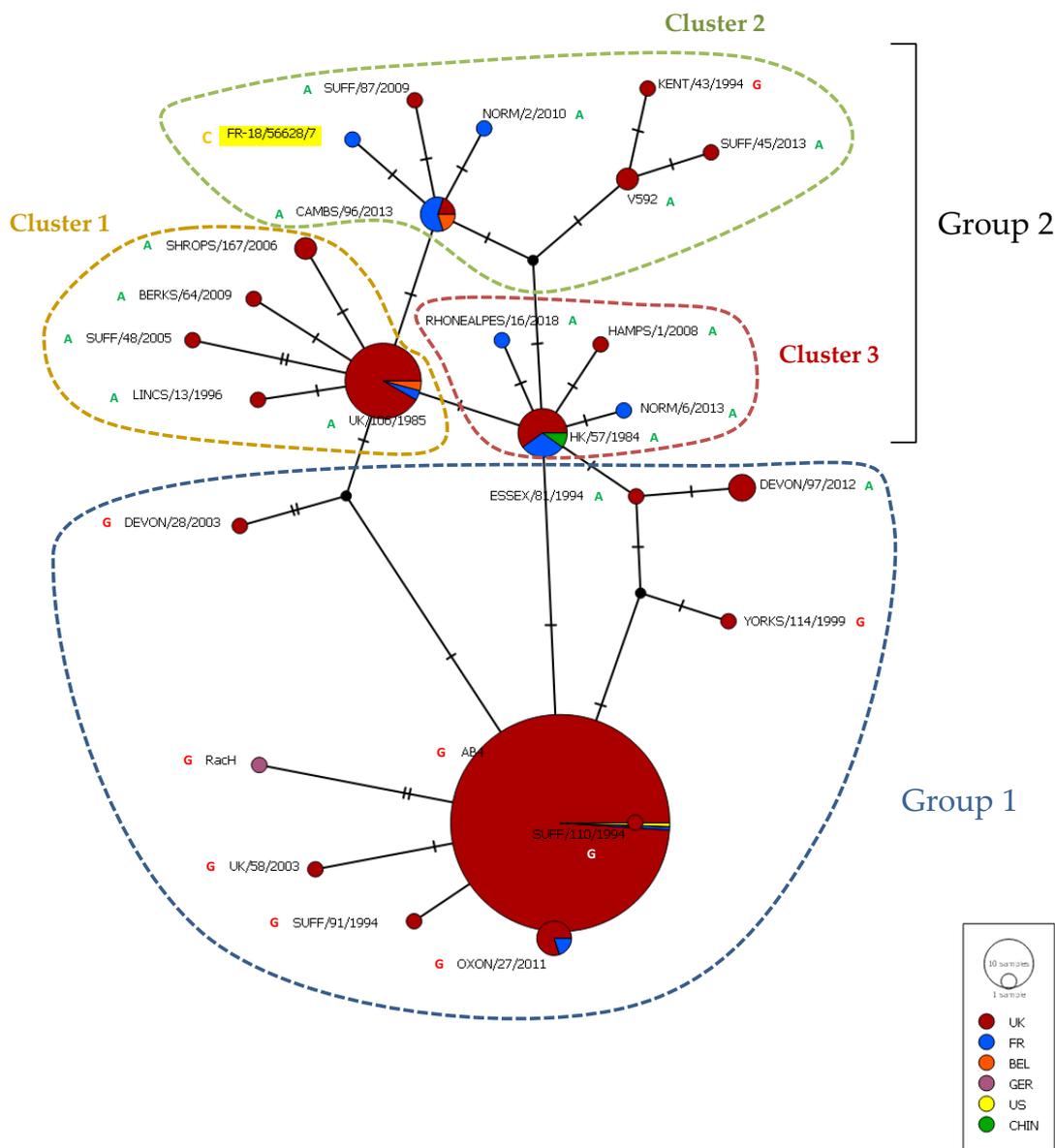


Figure 6. Median joining Network representing ORF30 nucleotide sequences of Ab4 and V592 reference strains, 67 EHV-1 strains previously described [50], 15 EHV-1 strains from France and Belgium [22] including the newly isolated EHV-1 strain FR-56628 (highlighted in yellow). The ORF30 position 2254 nucleotide is annotated.

The EHV-1 MLST as described by Garvey *et al.* 2019 [36], was also performed and the newly isolated strain was classified as U_L clade 10 (Supplementary Table S8). The EHV-1 strain FR-56628 MLST amino acid sequence was compared to 79 EHV-1 strains from the UK, Ireland, China, Australia, United States, Belgium and France and was grouped with the EHV-1 French strains NORM/2/2010, NORM18/2018, the EHV-1 Belgium strain BELG/12/2017, the EHV-1 UK strain SUFF/87/2009 and the EHV-1 Irish strain IRL/348/2002, all from U_L clade 10 (Figure 7). The amino acid change in ORF30 position 752 was the only discriminating the EHV-1 strain FR-56628 from the five other U_L clade 10 strains shown in this report (Supplementary Table S8). The U_L clade 10 EHV-1 strains NORM/2/2010, NORM/18/2018, BELG/12/2017 and SUFF/87/2009 were also grouped in the ORF30 cluster 2 as shown in the ORF30 Maximum Likelihood tree in Supplementary Figure S7.

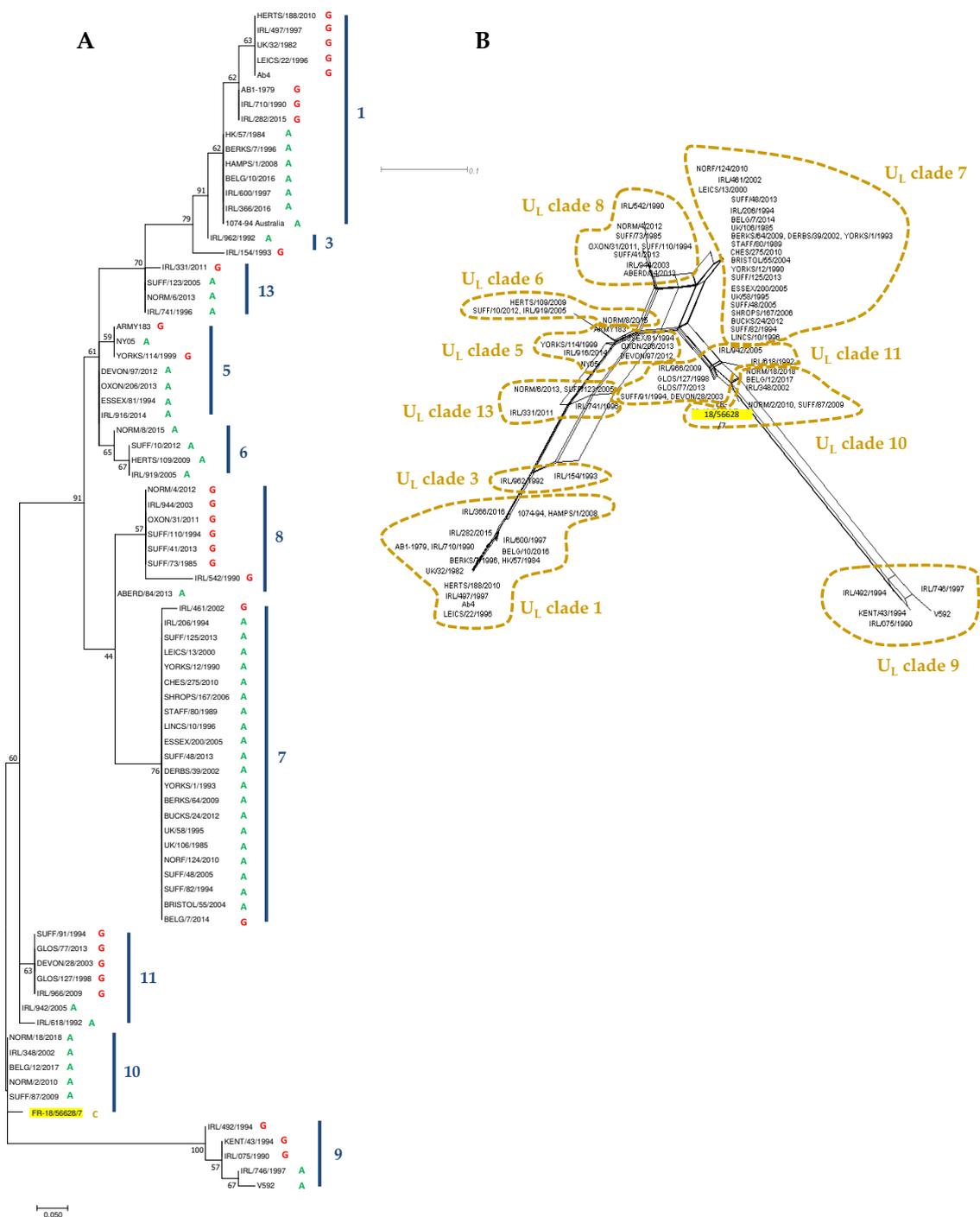


Figure 7. Maximum Likelihood phylogenetic tree based on Jones Taylor Thornton model (A) and Neighbour Joining Network (B) both built from MLST amino acid sequences from 46 strains from UK, 1 strain from China, 1 strain from US, 1 strain from Australia, 9 other strains from France and Belgium including the new strain FR-56628 (highlighted in yellow), and 22 strains from Ireland.

Two different ORF37 profiles were identified and confirmed for the EHV-1 strain FR-56628 isolated from Horse 13 (A₇₉₅ and G₇₉₅), which did not induce an amino acid change but suggests that two variants of the strain were isolated (V1 and V2, Table 3). V2 was the only variant isolated from Horse 10 sample.

Table 3. MLST codons alignment between reference strains Ab4 and V592, and strain FR-56628 variants V1 and V2, based on MLST. FR-56628 nucleotides in ORF30 position 2254 and ORF37 are highlighted in red.

Strain	RF													14
	l	75	40	40	65	03	13	213	378	474	477	495	1852-1860	
Ab4		GC	GC	AC	AG	GG	CA	CA	CC	AA	CT	CA	---	
FR-56628 V1	0	A.	T.	T.	CCCCAG CCG	
FR-56628 V2	0	A.	T.	T.	CCCCAG CCG	
V592		A.	T.	T.	CCCCAG CCG	

Strain	4	4	5	2	9	0	0	1	2	3	3	4	6	7	9	0
	882	074	96	288	4	254	968	68	24	3	926	96	39	93	318	86
Ab4	GA	GC	AT	CC	CG	AC	AG	AC	CG	AT	AT	AT	GC	CG	CA	GT
FR-56628 V1	G.	TA
FR-56628 V2	G.	T.
V592	A.	G.	T.	G.	..	T.	T.	A.

Strain	2	5	6	0	2	7	3	6
--------	---	---	---	---	---	---	---	---

	823	279	18	009	156	410	64	82
Ab4	AG	AA	TT	CG	CC	AG	CC	TT
FR-56628 V1	..	G.	C.	..	T.	G.	..	C.
FR-56628 V2	..	G.	C.	..	T.	G.	..	C.
V592	G.	G.	C.	..	T.	G.	T.	C.

nt = nucleotide position.

3.5. Experimental infection

Four 10 month-old welsh ponies were experimentally infected by nebulisation with EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄). Daily clinical scores were evaluated twice a day. As illustrated in Figure 8A and Supplementary Figure S9, all ponies showed a significant increase ($p < 0.0001$, multifactorial ANOVA with days as main effect and pony ID as covariates) of the cumulative clinical score from day 1 post-experimental infection, from the second checking point of the day. Overall, the cumulative clinical score started to decrease 10 to 14 days post-infection, depending on the individual, but remained above pre-infection level until the end of the study (i.e. 21 days after experimental infection). Pyrexia (i.e. body temperature $> 38.8^{\circ}\text{C}$) was measured in all ponies on day 1.5 post infection, on the second checking point of the day (Figure 8B). Abnormal body temperatures were mostly recorded in the afternoon and lasted from 4 to 8 days with peaks of temperature up to 40.6°C . Nasal discharge was first observed on day 1 and was recorded until the end of the study. Cough was recorded in all ponies on day 2 post-infection and intermittently thereafter. Mandibular lymph node enlargement was observed for one pony on day 2, and all four ponies from day 3 to day 11. All ponies showed signs of lethargy on day 2, and an overall reduction in food consumption was also noted during the first week post-infection. Finally, tail hypotonia was observed for all ponies, from day 2 post-infection and lasted 4 to 5 days.

Viral load quantification showed that virus shedding started on day 1 with a peak between days 2 and 6, depending on the pony (Figure 8C). From day 7, nasal shedding started to decrease but EHV-1 remained detectable in nasopharyngeal swabs from all ponies on day 16 post-infection, and was still detected in 2 out of 4 ponies on day 20. EHV-1 was detected in the blood sample collected from one pony on day 3, from 3 out of 4 ponies on day 5 and in blood samples from all four ponies from day 6 to the end of sampling (day 20). The peak was measured on day 9 (Figure 8D).

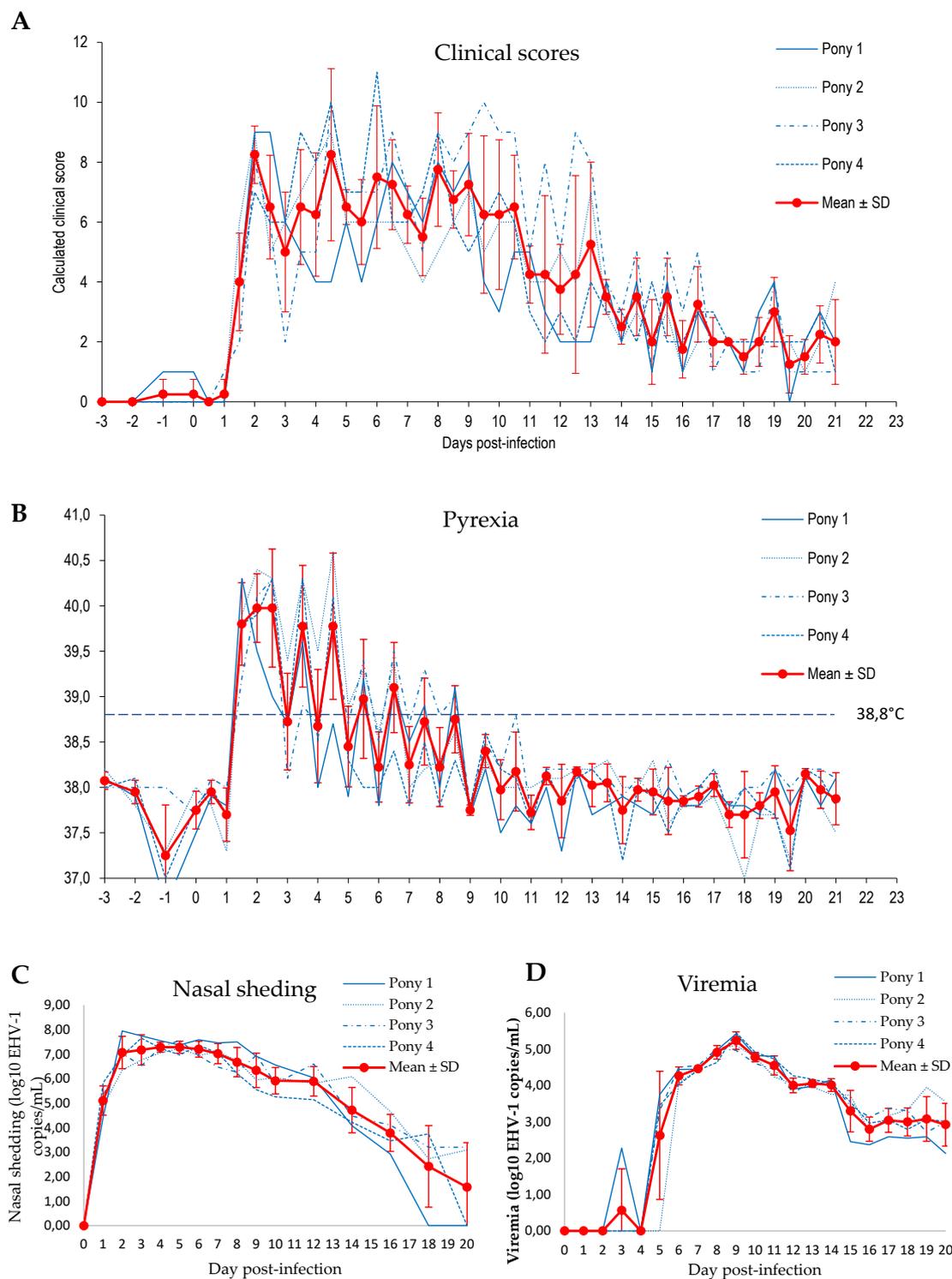


Figure 8. Clinical scores (A), pyrexia (B), nasal shedding (C) and viremia (D) observed from -3 days to 21 days post-infection with EHV-1 strain FR-56628 on four welsh ponies.

3.6. Antiviral assay

The activity of three antiviral compounds (aciclovir, aphidicolin and ganciclovir) was measured against 3 EHV-1 strains carrying the C₂₂₅₄ (H₇₅₂), A₂₂₅₄ (N₇₅₂), and G₂₂₅₄ (D₇₅₂) mutations (FR-56628, FR-6815 and FR-38991, respectively) and results are shown in Table 4. RTCA curves and viral load at 48 hpi for each

concentration of ganciclovir, aciclovir and aphidicolin against EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄) are shown in Supplementary Figure S10. Concerning the antiviral assay, results obtained by qPCR and RTCA showed that aphidicolin was the most effective compound against the three EHV-1 strains while aciclovir was the least effective. There was no significant difference of sensitivity ($p > 0.05$) between the three EHV-1 strains (FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂), FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) and FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂)) to ganciclovir and aphidicolin according to EC₅₀ values obtained from qPCR assay. When measured by impedancemetry, the EHV-1 strains FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) appeared to be more sensitive ($p = 0.046$) to aphidicolin than the FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) strain. According to EC₅₀ obtained from qPCR assay, the FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) and FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) strains were significantly more sensitive to aciclovir ($p = 0.012$ and 0.036 , respectively) than FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂). There was no significant difference of sensitivity between FR-56628 and FR-6815 to aciclovir using qPCR assay. Impedance measurements showed that FR-56628 was significantly more sensitive to aciclovir ($p = 0.019$) than FR-6815, but showed no significant difference of sensitivity between FR-56628 and FR-38991, and between FR-6815 and FR-38991.

Table 4. EC₅₀ (μ M) \pm Standard Deviation (SD) of ganciclovir (GCV), aciclovir (ACV) and aphidicolin (APD) against three different EHV-1 ORF30 2254 variants measured by qPCR assays and Real Time Cell Analysis (RTCA).

Strains	GCV		ACV		APD	
	qPCR	RTCA	qPCR	RTCA	qPCR	RTCA
FR-56628 (C ₂₂₅₄ /H ₇₅₂)	0.57 \pm 0.2	1.29 \pm 0.69	7.87 \pm 0.98 ^a	30.32 \pm 3.89 ^c	0.05 \pm 0.03	0.14 \pm 0.07
FR-6815 (A ₂₂₅₄ /N ₇₅₂)	0.75 \pm 0.44	2.49 \pm 1.20	14.15 \pm 5.27 ^b	56.19 \pm 11.04 ^c	0.09 \pm 0.04	0.19 \pm 0.03 ^b
FR-38991 (G ₂₂₅₄ /D ₇₅₂)	0.73 \pm 0.42	1.20 \pm 0.55	35.98 \pm 10.97 ^{ab}	35.09 \pm 10.32	0.09 \pm 0.04	0.09 \pm 0.05 ^b

a Significant difference between strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) and strain FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) ($p < 0.05$)

b Significant difference between strain FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) and strain FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) ($p < 0.05$)

c Significant difference between strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) and strain FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) ($p < 0.05$).

4. Discussion

Equid herpesvirus 1, which was first designated as Equine Abortion Virus [51] is a major cause of infectious abortion and can also cause sporadic EHM cases, in addition to usually mild respiratory infection. In 2006, Nugent *et al.* suggested that ORF30 position 2254 could discriminate a neuropathogenic genotype (G₂₂₅₄/D₇₅₂) from a non-neuropathogenic genotype (A₂₂₅₄/N₇₅₂) although the mechanisms involved are not well defined [17,20]. The current study reports the discovery of a third genotype with the isolation of a C₂₂₅₄/H₇₅₂ strain in one single site in France. The EHV-1 strain affecting these premises was isolated in 2018 and a new PCR assay was designed for the detection of the C₂₂₅₄ mutation and successfully discriminated A/G and C₂₂₅₄ strains in combination with a PCR assay designed by Allen *et al.* [33]. The C₂₂₅₄ mutation was not detected in strains from other premises in France between 2016 and 2020. Due to the absence of breeding activity on the affected premises, and the absence of further C₂₂₅₄/H₇₅₂ EHV-1 outbreaks since 2018, it is not possible to evaluate the effect of the C₂₂₅₄/H₇₅₂ EHV-1 strain in pregnant mares, at the current time. In addition, the site from which the strain was isolated is very restrictive on horse mixing and circulation, which could explain the absence of identification of any other C₂₂₅₄ strains since 2018 outbreak. It should also be taken into account that 2018 was a year with a large number of EHV outbreaks and consequently, with a large number of samples taken. The number of EHV outbreaks in France and associated sampling is usually much lower, restricting the opportunities for virus isolation. Despite anecdotal report of frequent vaccination in these premises (every 6 months), there was no information available on the immune status of the horses at the time of infection. Vaccine efficacy against this strain would need to be further investigated. Isolation from nasal swabs was not as successful as from co-culture with PBMC, which could be explained by the possible presence of interferon alpha (INF- α) in infected horses nasal secretions as shown in 2010 by Gryspeerdt *et al.* [52]. When cultured *in vitro*, the strain induced cytopathic effects (CPEs) associated with polykaryocytes and syncytia formation, as usually observed by microscopy in cell culture after infection

with EHV-1 [53]. The new EHV-1 strain, named FR-5628, questions the impact of ORF30 position 2254 mutation on the strain activity.

Based on the amino acid in position 752 (or equivalent) of DNA polymerase gene comparison between several herpesviruses, including the eight known equid herpesviruses (EHV-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 and 9), as already pointed out by Nugent *et al.* (2006), D₇₅₂ (or equivalent position in other herpesviruses) appears to be a highly conserved amino acid amongst the *Herpesviridae* family (supplementary Figure S11) [17]. It was suggested that D₇₅₂ strains were more likely to be ancestral strains from which N₇₅₂ would have evolved as shown in Figure 9, in which the G₂₂₅₄ strain KENT/64/1994 (see Figure 6) was proposed to have evolved from an A₂₂₅₄ strain from group 2 cluster 2. All of the sequences compared carried an aspartic acid (D) at this position with the exception of numerous EHV-1 strains (with V592 as a representative N₇₅₂ EHV-1 strain), and EHV-1 FR-56628, the only H₇₅₂ strain described to date [30]. To our knowledge, asparagine (N) and histidine (H) are the only two other amino acids identified in equid herpesviruses DNA polymerase gene in position 752. In addition, a study showed that N₇₅₂ strains (isolated from abortion) could infect equally monocytic CD172a⁺ cells and T lymphocytes, while D₇₅₂ strains (isolated from neurological cases) could infect CD172a⁺ cells in a larger proportion than T lymphocytes. In accordance with other studies, the authors suggested that N₇₅₂ had adapted their immune evasion strategy after co-evolving from D₇₅₂ strains with the host immune system [52,54,55]. Concerning the genotype/pathotype association suggested by Nugent *et al.* (2006), it was followed by Perkins *et al.* statistical report performed on 176 EHV-1 isolates and showing a strong but not strict association between G₂₂₅₄/D₇₅₂ strains and neurological disease, and A₂₂₅₄ strains and abortion disease. According to the authors, the probability for neurological disease to be associated with G₂₂₅₄/D₇₅₂ strains was 162 times greater than to A₂₂₅₄/N₇₅₂ strains [56]. Several studies have then showed that this genotype/pathotype association is not exclusive [21,22,57–59]. The discovery of a third genotype C₂₂₅₄/H₇₅₂ and its potential association with neurological signs makes the understanding of the genotype/pathotype association even more complex. EHV-1 is the only equid herpesvirus known to have possibly evolved from D₇₅₂ strains to N₇₅₂ and H₇₅₂ strains. Alongside with EHV-8, EHV-9, these three viruses are also the only equid herpesviruses to our knowledge that have been reported as causing neurological diseases. This observation is in line with other statements suggesting that the amino acid in position 2254 is not the only determinant for neurovirulence and could also depend on the environment (air quality, stress, training management, etc.), the immune status of the horse and genetic background [9,56,60].

An antiviral assay with the newly isolated FR-56628 EHV-1 strain and two other A/G₂₂₅₄ strains was performed with ganciclovir, aciclovir and aphidicolin. Ganciclovir and aciclovir are two nucleoside analogues (analogues to deoxyguanosine). Indeed, triphosphorylated ganciclovir and aciclovir act as competitive nucleotide substrates for DNA polymerase [46,47]. When phosphorylated, first by the viral thymidine kinase (TK) and then by the cellular TK, ganciclovir and aciclovir are incorporated in the synthesised DNA strand. The replication will stop either straight after (aciclovir), or after the incorporation of several nucleotides (ganciclovir) [61]. Aphidicolin is a tetracyclic diterpen and has been described to inhibit the activity of B-family DNA polymerase (to which EHV-1 DNA polymerase belongs) as a competitive dNTP binding site molecule [62]. Some studies showed a good efficacy of this molecule against human herpesviruses, especially in strains resistant to nucleoside analogues [63–65]. Herpesvirus DNA polymerase crystal structure has only been described for HSV-1. However, as explained in 2007 by Goodman *et al.*, the EHV-1 amino acid D₇₅₂ (G₂₂₅₄) residue is homologous to HSV-1 amino acid D751 residue which is located in the palm domain, a region close to the dNTP binding domain (fingers domain) [18,66,67]. In addition, in their *in vivo* study, Goodman *et al.* (2007) suggest that amino acid change from D₇₅₂ (G₂₂₅₄) to N₇₅₂ (A₂₂₅₄) could alter DNA polymerase activity after they highlighted aphidicolin was less effective against DNA polymerase N₇₅₂ (A₂₂₅₄) mutant and N₇₅₂ (A₂₂₅₄) strain than against DNA polymerase D₇₅₂ (G₂₂₅₄) mutant and D₇₅₂ (G₂₂₅₄) strain [18]. After binding a dNTP, the DNA polymerase subdomain rotates and change conformation to allow this dNTP incorporation [66,68]. Aphidicolin may change fingers and palm domain interaction as it is described with Human Pol α by Baranosvki *et al.* [62]. The impact of an amino acid change in the palm domain on the interaction of aphidicolin, but also possibly ganciclovir and aciclovir with the DNA polymerase dNTP binding site was therefore questioned. In this study, aphidicolin and ganciclovir

showed a good *in vitro* effect against the three EHV-1 strains (FR-56628, FR-6815 and FR-38991), while a higher concentration of aciclovir was required to inhibit these three strains replication. As both ganciclovir and aciclovir require the viral TK for their first phosphorylation, it is unlikely that aciclovir lower efficacy was due to strain TK resistances. The 3D models of the EHV-1 DNA polymerase based on the HSV-1 DNA polymerase model did not predict an effect of an amino acid change in position 752 on the protein function. In addition, antiviral assays did not show an evident influence of position 752 amino acid residue on either ganciclovir or aphidicolin efficacy *in vitro* (no significant EC₅₀ difference between FR-56628 and FR-6815, and between FR-56628 and FR-38991). EC₅₀ measured by impedance measurement showed that aphidicolin was significantly more efficient against FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) than against FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂), but this was not confirmed by qPCR assay. Even if a good correlation between RTCA and qPCR EC₅₀ values has been demonstrated, impedance method depends on parameters that are more variable than qPCR assay which can explain the differences [69]. Aciclovir showed differences of efficacy against the three strains which were not reproduced with the two methods. As nucleotide position 2254 is not the only site where non synonymous mutations occur in ORF30, these could also imply changes of DNA polymerase conformation different from the strains used in Goodman et al. (2007) study and constitute a possible explanation for the aphidicolin effects observed in the two studies.

When compared to 83 other EHV-1 strains, the complete ORF30 nucleotide sequence of the newly isolated EHV-1 strain FR-56628 showed that, in addition to the mutation in position 2254 position, this part of the genome had from none to three other mutations when compared to the other EHV-1 strains in group 2 cluster 2. This cluster is mainly represented by A₂₂₅₄ strains with the exception of one G₂₂₅₄ strain and FR-56628 C₂₂₅₄ strain. As all other G₂₂₅₄ strains are clustered in the ORF30 group 1, it is not excluded that some EHV-1 A₂₂₅₄ strains from this cluster (group 2) reversed to EHV-1 G₂₂₅₄ strains or evolved to a C₂₂₅₄ strain (Figure 9). Considering the amino acid sequence, the EHV-1 MLST placed the EHV-1 strain FR-56628 among the U_L clade 10 alongside five EHV-1 strains also classified in ORF30 group 2 cluster 2. The amino acid change in ORF30 position 752 differentiates the strain FR-56628 MLST sequence from the other members of the U_L clade 10 used in this study. However, the nucleotide MLST sequence not only showed another silent variation site in ORF37, but also suggested that two different FR-56628 variants have been isolated from Horse 13. ORF37 is a conserved gene among alphaherpesviruses and encodes the HSV-1 UL24 homolog [16]. On the contrary to ORF30, this gene has been classified among the non-essential genes for growth on cultured cells [70,71]. HSV-1 UL24 has been shown to play a role in pathogenicity and to affect *in vivo* and *in vitro* replication and reactivation from latency [72,73]. This protein seems to carry numerous functions such as viral gene expression regulation, dispersion of cellular proteins in the nucleus and glycoproteins distribution in the cytoplasm [74,75]. It was also shown to be required for EHV-1 pathogenicity in mouse model [70]. Numerous transcription initiation sites and therefore transcripts have been identified for HSV-1 UL24. The impact of the silent mutation detected in this study on different transcripts from different transcription initiation sites is unknown, although all the ATG codons from EHV-1 ORF37 seemed to be in the same reading frame. This silent mutation was not identified in the EHV-1 strain isolated from Horse 10 but no information are available concerning other horses, making it difficult to date the mutation event. Indeed, the strain could either have mutated after infecting Horse 13, or this could also be the result of a double infection with the two variants, after physical contacts with different horses.

Experimental infection of four 10 month-old welsh ponies with EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄) induced characteristic clinical signs of EHV-1 infection on all ponies starting from Day 1 post infection. None of the horses showed neurological clinical signs but EHM is difficult to reproduce in experimental infections [7,76–78]. However, the rapid onset of clinical signs, nasal shedding and viremia were in accordance with previous experimental challenges performed using EHV-1 strains V592 (A₂₂₅₄) and Ab4 (G₂₂₅₄) with slightly lower (10^{5.5} TCID₅₀ and 10^{6.6} TCID₅₀ for example) or similar (10^{7.5}, 10^{7.6} for example) infectious doses [6,7,77,79].

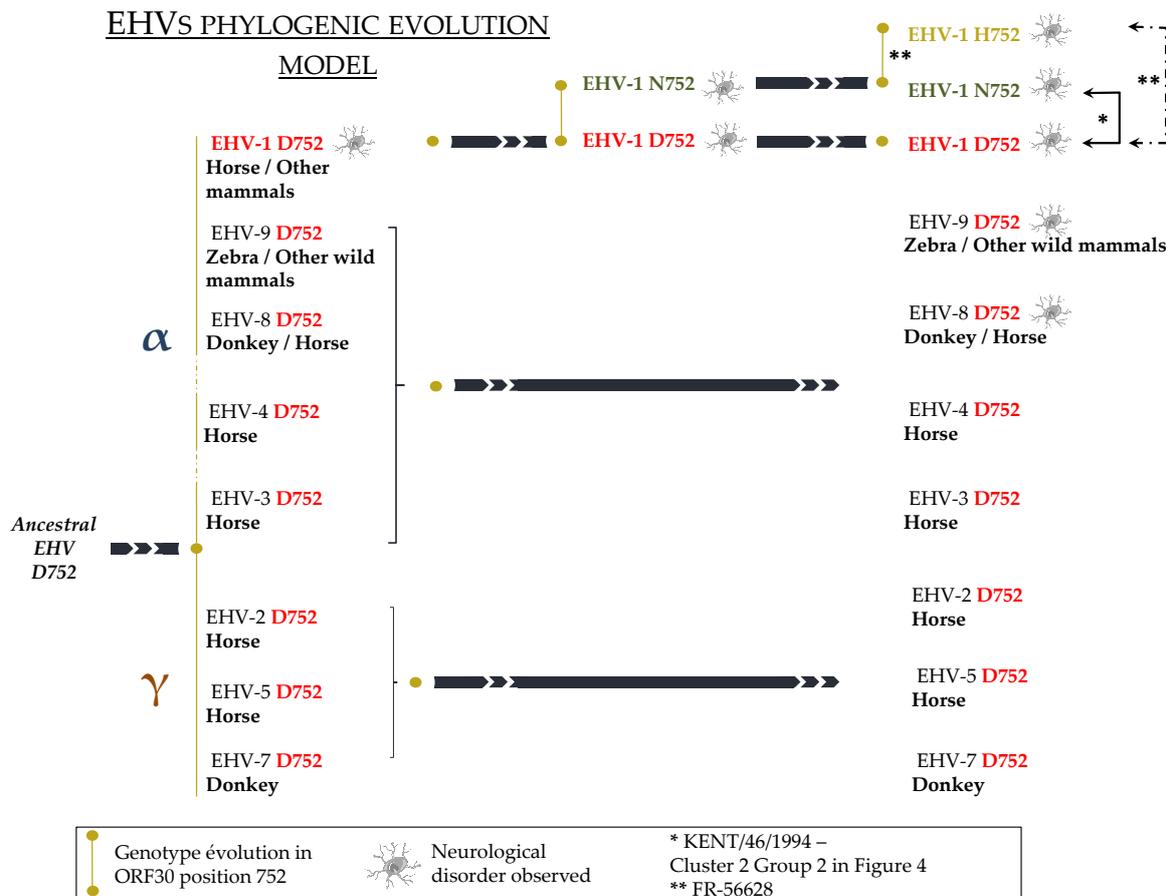


Figure 9. Possible evolutionary model for equid herpesviruses. Reverse evolution are shown with black arrows and illustrated with strains from the current study (KENT/46/1994 (*) and FR-56628 (**)).

5. Conclusions

To conclude, this study described the isolation of a new 2254 mutant strain (C_{2254}/H_{752}) from a unique site in France in 2018 and associated with a large number of affected animals despite frequent vaccination. There was no other identification or isolation of C_{2254} EHV-1 strains before 2018, nor in 2019 and 2020. Pathogenicity of this strain was confirmed in the context of an *in vivo* experimental infection that highlighted rapid onset of disease and significant excretion and cell-associated viremia. The impact of the mutation on ganciclovir, aciclovir and aphidicolin susceptibility was limited. The molecular characterisation of the strain, the predictive 3D model of the ORF30, the *in vitro* culture, taken all together did no show evidence of a major impact of this new C_{2254} mutation on the strain behaviour. Most of equine herpesviruses have the D_{752} mutation. EHV-1 is the only equine herpesvirus to carry the N_{752} or H_{752} mutations. That is why ORF30 and MLST phylogeny tend to indicate that this C_{2254}/H_{752} has evolved from N_{752} strains.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: ORF30 position 2254 typing using the three different probes (A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ and C₂₂₅₄) in order to check the probe C₂₂₅₄ specificity. Samples isolated from the premises described in section 3.1, are indicated in bold. ND = not determined. Table S2: PCR 1, 2, 4 and 5 primers and probes sequences, thermoprofiles and mixtures. Table and Figure S3: complete ORF30 sequencing primers (A) and their distribution on ORF30 (B). Table S4: PCR results, viral load and ORF30 position 2254 subtype on the 14 nasal swabs collected on the premises described in section 3.1. ND = not determined. Figure S5: ORF30 nucleotide alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052). Figure S6: ORF30 amino acid alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052). Figure S7: Maximum Likelihood Tree based on Tamura-Nei model and built using ORF30 sequences of Ab4 and V592 reference strains, 67 EHV-1 strains previously described (Bryant et al. 2018), 14 EHV-1 strains from France and Belgium (Sutton et al. 2019) and the EHV-1 strain FR-56628 (highlighted in yellow). The ORF30 2254 nucleotide is annotated. Table S8: EHV-1 strain FR-56628 MLST amino acid sequence compared to EHV-1 reference strains Ab4 and V592 (A) and to U_L clade 10 EHV-1 strains (B). Figure S9: Number of horses experiencing nasal discharge/cough/ocular discharge (A), mandibular lymph node enlargement (B) and pyrexia/attitude (C). Figure S10: Antiviral analysis of the effect of (A) GCV, (B) ACV and (C) APD using (i) impedancemetry measurement, (ii) viral load quantification. Figure S11: Amino Acid in ORF30 position 752 (or equivalent region) of 18 Herpesviruses (A). Conserved amino acids on a 106 bp region of 18 herpesviruses DNA polymerase gene are highlighted in shades of blue (when 9/18 or more herpesviruses contained the same amino acid). Aspartic acid in position 752 or equivalent are highlighted in red, and variants are highlighted in yellow (B).

Author Contributions: Here are described the contribution of the authors for this research article: conceptualisation, R.P., S.P., and G.S.; investigation, C.T., C.F., E.H., R.P., S.P., A.L., A.D., E.G. and G.S.; resources, C.F., E.H., C.M-P.; writing—original draft preparation, R.P., S.P., C.T. and G.S.; writing—review and editing, R.P., S.P., C.T., E.H., E.G. and G.S.; supervision, R.P. and S.P.; project administration, R.P. and S.P.; funding acquisition, R.P. and S.P.

Funding: This research was funded by the Fonds Eperon OVERLORD N12-2017, Normandy County Council (17E01598/17EP04324), the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) grant number 2017-008, CENTAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational programme 2014-2020.

Acknowledgments: We would like to thank the veterinarians who allowed the collection of samples on the infectious premises, Udeni Balasuriya for sharing some discussion elements and the UEPAO and its members for their work during the experimental infection. We would also like to thank Samuel Fremaux for his help during his internship.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Davison, A.J. Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology* **2010**, *143*, 52–69, doi:10.1016/j.vetmic.2010.02.014.
2. Wohlsein, P.; Lehmbecker, A.; Spitzbarth, I.; Algermissen, D.; Baumgärtner, W.; Böer, M.; Kummrow, M.; Haas, L.; Grummer, B. Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts. *Veterinary Microbiology* **2011**, *149*, 456–460, doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.024.
3. Ibrahim, E.S.M.; Kinoh, M.; Matsumura, T.; Kennedy, M.; Allen, G.P.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H. Genetic relatedness and pathogenicity of equine herpesvirus 1 isolated from onager, zebra and gazelle. *Arch Virol* **2007**, *152*, 245–255, doi:10.1007/s00705-006-0855-3.
4. Patel, J.R.; Edington, N.; Mumford, J.A. Variation in cellular tropism between isolates of Equine herpesvirus-1 in Foals. *Archives of Virology* **1982**, *74*, 41–51, doi:10.1007/BF01320781.
5. Kydd, J.H.; Smith, K.C.; Hannant, D.; Livesay, G.J.; Mumford, J.A. Distribution of Equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. *Equine Veterinary Journal* **1994**, *26*, 466–469, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04051.x.
6. Kydd, J.H.; Smith, K.C.; Hannant, D.; Livesay, G.J.; Mumford, J.A. Distribution of Equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Veterinary Journal* **1994**, *26*, 470–473, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04052.x.
7. Edington, N.; Bridges, C.G.; Patel, J.R. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: Equine stroke. *Archives of Virology* **1986**, *90*, 111–124, doi:10.1007/BF01314149.

8. Edington, N.; Smyth, B.; Griffiths, L. The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) Abortions. *Journal of Comparative Pathology* **1991**, *104*, 379–387, doi:10.1016/S0021-9975(08)80148-X.
9. Allen, G.P. Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4. In *Equine Respiratory Diseases*; International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
10. Paillet, R.; Case, R.; Ross, J.; Newton, R.; Nugent, J. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. *TOVSJ* **2008**, *2*, 68–91, doi:10.2174/1874318808002010068.
11. Welch, H.M.; Bridges, C.G.; Lyon, A.M.; Griffiths, L.; Edington, N. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *Journal of General Virology* **1992**, *73*, 261–268, doi:10.1099/0022-1317-73-2-261.
12. Slater, J.D.; Borchers, K.; Thackray, A.M.; Field, H.J. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology* **1994**, *75*, 2007–2016, doi:10.1099/0022-1317-75-8-2007.
13. Edington, N.; Bridges, C.G.; Huckle, A. Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. *Equine Veterinary Journal* **1985**, *17*, 369–372, doi:10.1111/j.2042-3306.1985.tb02524.x.
14. Allen, G.P. Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. **2006**, *67*, 5.
15. Edington, N.; Welch, H.M.; Griffiths, L. The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Veterinary Journal* **1994**, *26*, 140–142, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04353.x.
16. Telford, E.A.R.; Watson, M.S.; McBride, K.; Davison, A.J. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **1992**, *189*, 304–316, doi:10.1016/0042-6822(92)90706-U.
17. Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.C.; Mumford, J.A.; Swann, Z.; Newton, J.R.; Bowden, R.J.; Allen, G.P.; Davis-Poynter, N. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *J Virol* **2006**, *80*, 4047–4060, doi:10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006.
18. Goodman, L.B.; Loregian, A.; Perkins, G.A.; Nugent, J.; Buckles, E.L.; Mercorelli, B.; Kydd, J.H.; Palù, G.; Smith, K.C.; Osterrieder, N.; et al. A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase Determines Neuropathogenicity. *PLoS Pathog* **2007**, *3*, doi:10.1371/journal.ppat.0030160.
19. Van de Walle, G.R.; Goupil, R.; Wishon, C.; Damiani, A.; Perkins, G.A.; Osterrieder, N. A Single-Nucleotide Polymorphism in a Herpesvirus DNA Polymerase Is Sufficient to Cause Lethal Neurological Disease. *J INFECT DIS* **2009**, *200*, 20–25, doi:10.1086/599316.
20. Lunn, D.P.; Davis-Poynter, N.; Flaminio, M.J.B.F.; Horohov, D.W.; Osterrieder, K.; Pusterla, N.; Townsend, H.G.G. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **2009**, *23*, 450–461, doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x.
21. Pronost, S.; Léon, A.; Legrand, L.; Fortier, C.; Miszczak, F.; Freymuth, F.; Fortier, G. Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Veterinary Microbiology* **2010**, *145*, 329–333, doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.031.
22. Sutton; Garvey; Cullinane; Jourdan; Fortier; Moreau; Foursin; Gryspeerdt; Maisonnier; Marcillaud-Pitel; et al. Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion. *Viruses* **2019**, *11*, 916, doi:10.3390/v11100916.
23. Allen, G.P.; Breathnach, C.C. Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV- 1. *Equine Veterinary Journal* **2010**, *38*, 252–257, doi:10.2746/042516406776866453.
24. Heldens, J.G.M.; Hannant, D.; Cullinane, A.A.; Prendergast, M.J.; Mumford, J.A.; Nelly, M.; Kydd, J.H.; Weststrate, M.W.; van den Hoven, R. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine* **2001**, *19*, 4307–4317, doi:10.1016/S0264-410X(01)00131-1.
25. Goodman, L.; Wagner, B.; Flaminio, M.; Sussman, K.; Metzger, S.; Holland, R.; Osterrieder, N. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with

- neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Vaccine* **2006**, *24*, 3636–3645, doi:10.1016/j.vaccine.2006.01.062.
26. Goehring, L.S.; Wagner, B.; Bigbie, R.; Hussey, S.B.; Rao, S.; Morley, P.S.; Lunn, D.P. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine* **2010**, *28*, 5203–5211, doi:10.1016/j.vaccine.2010.05.065.
 27. 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.; et al. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology* **2019**, *526*, 105–116, doi:10.1016/j.virol.2018.10.013.
 28. 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. *Veterinary Microbiology* **2007**, *122*, 43–51, doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.004.
 29. Maxwell, L.K.; Bentz, B.G.; Bourne, D.W.A.; Erkert, R.S. Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **2008**, *31*, 312–320, doi:10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x.
 30. Paillet, R.; Sutton, G.; Thieulent, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Pronost, S. New EHV-1 variant identified. *Veterinary Record* **2020**, *186*, 573.1-573, doi:10.1136/vr.m1441.
 31. Diallo, I.S.; Hewitson, G.; Wright, L.; Rodwell, B.J.; Corney, B.G. Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **2006**, *131*, 92–98, doi:10.1016/j.jviromet.2005.07.010.
 32. Pronost, S.; Legrand, L.; Pitel, P.-H.; Wegge, B.; Lissens, J.; Freymuth, F.; Richard, E.; Fortier, G. Outbreak of Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy in France: a Clinical and Molecular Investigation: Outbreak of EHV-1 myeloencephalopathy. *Transboundary and Emerging Diseases* **2012**, *59*, 256–263, doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01263.x.
 33. Allen, G.P. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Diagnosis of Neuropathogenic Strains of Equine Herpesvirus-1. *J VET Diagn Invest* **2007**, *19*, 69–72, doi:10.1177/104063870701900110.
 34. Hall, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **1999**, 95–98.
 35. Leigh, J.W.; Bryant, D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* **2015**, *6*, 1110–1116, doi:10.1111/2041-210X.12410.
 36. Garvey, M.; Lyons, R.; Hector, R.; Walsh, C.; Arkins, S.; Cullinane, A. Molecular Characterisation of Equine Herpesvirus 1 Isolates from Cases of Abortion, Respiratory and Neurological Disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens* **2019**, *8*, 7, doi:10.3390/pathogens8010007.
 37. Huson, D.H.; Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* **2006**, *23*, 254–267, doi:10.1093/molbev/msj030.
 38. Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **2015**, *10*, 845–858, doi:10.1038/nprot.2015.053.
 39. Hue, E.; Richard, E.; Fortier, C.; Fortier, G.; Paillet, R.; Raue, R.; Pronost, S. Equine PBMC Cytokines Profile after In Vitro α - and γ -EHV Infection: Efficacy of a Parapoxvirus Ovis Based-Immunomodulator Treatment. *Vaccines* **2017**, *5*, 28, doi:10.3390/vaccines5030028.
 40. Ramakrishnan, M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *WJV* **2016**, *5*, 85, doi:10.5501/wjv.v5.i2.85.
 41. Fang, Y.; Ye, P.; Wang, X.; Xu, X.; Reisen, W. Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *Journal of Virological Methods* **2011**, *173*, 251–258, doi:10.1016/j.jviromet.2011.02.013.
 42. OIE World Organization for Animal Health. Available online: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (accessed on Aug 30, 2020).
 43. Garrett, D.; Montesso, F.; Fougere, S.; Lopez-Alvarez, M.R.; Birand, I.; De Bock, M.; Huang, C.M.; Legrand, L.; Pronost, S.; Paillet, R. Refinement of the equine influenza model in the natural host: A meta-analysis to determine the benefits of individual nebulisation for experimental infection and vaccine evaluation in the face of decreased strain pathogenicity. *Veterinary Microbiology* **2017**, *211*, 150–159, doi:10.1016/j.vetmic.2017.10.010.
 44. PFIE Infectiology of Farm, Model and Wild Animals Facility. **2018**, doi:10.15454/1.5572352821559333E12.

45. Paillot, R.; Prowse, L.; Donald, C.; Medcalf, E.; Montesso, F.; Bryant, N.; Watson, J.; Jeggo, M.; Elton, D.; Newton, R.; et al. Efficacy of a whole inactivated EI vaccine against a recent EIV outbreak isolate and comparative detection of virus shedding. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2010**, *136*, 272–283, doi:10.1016/j.vetimm.2010.03.019.
46. Elion, G.B. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1983**, *12*, 9–17, doi:10.1093/jac/12.suppl_B.9.
47. Matthews, T.; Boehme, R. Antiviral Activity and Mechanism of Action of Ganciclovir. *Clinical Infectious Diseases* **1988**, *10*, S490–S494, doi:10.1093/clinids/10.Supplement_3.S490.
48. Sheaff, R.; Ilsley, D.; Kuchta, R. Mechanism of DNA polymerase .alpha. inhibition by aphidicolin. *Biochemistry* **1991**, *30*, 8590–8597, doi:10.1021/bi00099a014.
49. StatGraphics Plus. Available online: <https://www.statgraphics.com/> (accessed on Aug 30, 2020).
50. Bryant, N.A.; Wilkie, G.S.; Russell, C.A.; Compston, L.; Grafham, D.; Clissold, L.; McLay, K.; Medcalf, L.; Newton, R.; Davison, A.J.; et al. Genetic diversity of equine herpesvirus 1 isolated from neurological, abortigenic and respiratory disease outbreaks. *Transbound Emerg Dis* **2018**, *65*, 817–832, doi:10.1111/tbed.12809.
51. Dimock, W.; Edwards, P. Is there a filterable virus of abortion in mares. *Bull. Kentucky Agriculture Experiment Station* **1933**, 291–301.
52. Gryspeerdt, A.C.; Vandekerckhove, A.P.; Garré, B.; Barbé, F.; Van de Walle, G.R.; Nauwynck, H.J. Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses. *Veterinary Microbiology* **2010**, *142*, 242–253, doi:10.1016/j.vetmic.2009.10.015.
53. Wellington, J.E.; Love, D.N.; Whalley, J.M. Evidence for involvement of equine herpesvirus 1 glycoprotein B in cell-cell fusion. *Archives of Virology* **1996**, *141*, 167–175, doi:10.1007/BF01718598.
54. Poelaert, K.C.K.; Van Cleemput, J.; Laval, K.; Favoreel, H.W.; Couck, L.; Van den Broeck, W.; Azab, W.; Nauwynck, H.J. Equine Herpesvirus 1 Bridles T Lymphocytes To Reach Its Target Organs. *J Virol* **2019**, *93*, e02098-18, [jvi/93/7/JVI.02098-18.atom](https://doi.org/10.1128/JVI.02098-18), doi:10.1128/JVI.02098-18.
55. Laval, K.; Van Cleemput, J.; Poelaert, K.C.; Brown, I.K.; Nauwynck, H.J. Replication of neurovirulent equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in CD172a+ monocytic cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **2017**, *50*, 58–62, doi:10.1016/j.cimid.2016.11.006.
56. Perkins, G.A.; Goodman, L.B.; Tsujimura, K.; Van de Walle, G.R.; Kim, S.G.; Dubovi, E.J.; Osterrieder, N. Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984–2007). *Veterinary Microbiology* **2009**, *139*, 375–378, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.033.
57. Vissani, M.A.; Becerra, M.L.; Olguín Perglione, C.; Tordoya, M.S.; Miño, S.; Barrandeguy, M. Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Veterinary Microbiology* **2009**, *139*, 361–364, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.025.
58. Fritsche, A.-K.; Borchers, K. Detection of neuropathogenic strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. *Veterinary Microbiology* **2011**, *147*, 176–180, doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.014.
59. Pusterla, N.; Hatch, K.; Crossley, B.; Wademan, C.; Barnum, S.; Flynn, K. Equine herpesvirus-1 genotype did not significantly affect clinical signs and disease outcome in 65 horses diagnosed with equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy. *The Veterinary Journal* **2020**, *255*, 105407, doi:10.1016/j.tvjl.2019.105407.
60. Pronost, S.; Cook, R.F.; Fortier, G.; Timoney, P.J.; Balasuriya, U.B.R. Relationship between equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy and viral genotype: EHV-1, genotype and EHM. *Equine Veterinary Journal* **2010**, *42*, 672–674, doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00307.x.
61. Shiraki, K. Antiviral Drugs Against Alphaherpesvirus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1045*, 103–122, doi:10.1007/978-981-10-7230-7_6.
62. Baranovskiy, A.G.; Babayeva, N.D.; Suwa, Y.; Gu, J.; Pavlov, Y.I.; Tahirov, T.H. Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin. *Nucleic Acids Research* **2014**, *42*, 14013–14021, doi:10.1093/nar/gku1209.
63. Bucknall, R.A.; Moores, H.; Simms, R.; Hesp, B. Antiviral Effects of Aphidicolin, a New Antibiotic Produced by *Cephalosporium aphidicola*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1973**, *4*, 294–298, doi:10.1128/AAC.4.3.294.
64. Michaelis, M.; Langer, K.; Vogel, J.-U.; Kreuter, J.; Rabenau, H.; Doerr, H.-W.; Cinatl, J. In vitro Antiviral Activity of Aphidicolin and its Derivates. *Arzneimittelforschung* **2011**, *52*, 393–399, doi:10.1055/s-0031-1299904.
65. Larder, B.A.; Darby, G. Susceptibility to other antitherpes drugs of pathogenic variants of herpes simplex virus selected for resistance to acyclovir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1986**, *29*, 894–898, doi:10.1128/AAC.29.5.894.

66. Zarrouk, K.; Piret, J.; Boivin, G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Research* **2017**, *234*, 177–192, doi:10.1016/j.virusres.2017.01.019.
67. Liu, S.; Knafels, J.D.; Chang, J.S.; Waszak, G.A.; Baldwin, E.T.; Deibel, M.R.; Thomsen, D.R.; Homa, F.L.; Wells, P.A.; Tory, M.C.; et al. Crystal Structure of the Herpes Simplex Virus 1 DNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 18193–18200, doi:10.1074/jbc.M602414200.
68. Berdis, A.J. Inhibiting DNA Polymerases as a Therapeutic Intervention against Cancer. *Front. Mol. Biosci.* **2017**, *4*, 78, doi:10.3389/fmolb.2017.00078.
69. Thieulent, C.; Hue, E.S.; Sutton, G.; Fortier, C.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Paillet, R.; Vidalain, P.-O.; et al. Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: Efficacy of decitabine and valganciclovir alone or in combination. *Antiviral Research* **2020**, *183*, 104931, doi:10.1016/j.antiviral.2020.104931.
70. Kasem, S.; Yu, M.H.H.; Yamada, S.; Kodaira, A.; Matsumura, T.; Tsujimura, K.; Madbouly, H.; Yamaguchi, T.; Ohya, K.; Fukushi, H. The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* **2010**, *400*, 259–270, doi:10.1016/j.virol.2010.02.012.
71. Pearson, A.; Coen, D.M. Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *JVI* **2002**, *76*, 10821–10828, doi:10.1128/JVI.76.21.10821-10828.2002.
72. Leiva-Torres, G.A.; Rochette, P.A.; Pearson, A. Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *Journal of General Virology* **2010**, *91*, 1109–1116, doi:10.1099/vir.0.017921-0.
73. Jacobson, J.G.; Martin, S.L.; Coen, D.M. A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *Journal of Virology* **1989**, *63*, 1839–1843, doi:10.1128/JVI.63.4.1839-1843.1989.
74. Sanabria-Solano, C.; Gonzalez, C.E.; Richerieux, N.; Bertrand, L.; Dridi, S.; Griffiths, A.; Langelier, Y.; Pearson, A. Regulation of viral gene expression by the herpes simplex virus 1 UL24 protein (HSV-1 UL24 inhibits accumulation of viral transcripts). *Virology* **2016**, *495*, 148–160, doi:10.1016/j.virol.2016.05.006.
75. Dridi, S.; Richerieux, N.; Gonzalez Suarez, C.E.; Vanharen, M.; Sanabria-Solano, C.; Pearson, A. A Mutation in the UL24 Gene Abolishes Expression of the Newly Identified UL24.5 Protein of Herpes Simplex Virus 1 and Leads to an Increase in Pathogenicity in Mice. *J Virol* **2018**, *92*, e00671-18, /jvi/92/20/e00671-18.atom, doi:10.1128/JVI.00671-18.
76. Hussey, G.; Goehring, L.S.; Lunn, D.P.; Hussey, S.B.; Huang, T.; Osterrieder, N.; Powell, C.; Hand, J.; Holz, C.; Slater, J. Experimental infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces chorioretinal lesions. *Vet Res* **2013**, *44*, 118, doi:10.1186/1297-9716-44-118.
77. Goehring, L.S.; van Maanen, C.; Berendsen, M.; Cullinane, A.; de Groot, R.J.; Rottier, P.J.M.; Wesselingh, J.J.C.M.; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M. Experimental infection with neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) in adult horses. *The Veterinary Journal* **2010**, *186*, 180–187, doi:10.1016/j.tvjl.2009.08.007.
78. Allen, G.P. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *American Journal of Veterinary Research* **2008**, *69*, 1595–1600, doi:10.2460/ajvr.69.12.1595.
79. Smith, K.; Whitwell, K.; Mumford, J.; Hannant, D.; Blunden, A.; Tearle, J. Virulence of the V592 Isolate of Equid Herpesvirus-1 in Ponies. *Journal of Comparative Pathology* **2000**, *122*, 288–297, doi:10.1053/jcpa.1999.0373.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 5 : Posters présentés durant ma thèse

Real-Time monitoring of Equid herpesviruses infectivity in equine dermal cell based on impedance measurements: effects of acyclovir treatment

E. Hue^{1,2,3}, C. Thieulent^{1,3}, C. Fortier¹, P. Suzanne^{3,4}, S. Zientara⁵, A. Hans⁶, H. Munier-Lehmann⁷, P-O. Vidalain⁸ and S. Pronost^{1,2,3}

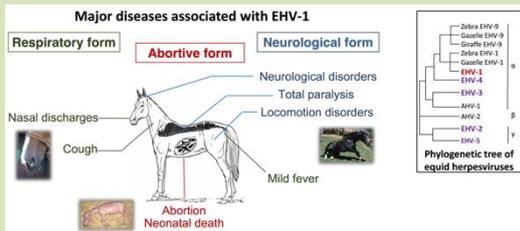


¹ LABÉO Frank Duncombe, Caen, France; ² Unité Recherche Risques Microbiens (U2RM), EA 4655, Caen, France; ³ Normandie Université, Caen, France
⁴ Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Caen, France; ⁵ Anses UMR 1161 Virologie, Maisons-Alfort, France; ⁶ Anses, Unité de Virologie, Dozulé, France
⁷ Institut Pasteur, Paris, France; ⁸ CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, Paris, France



Introduction

Horses are usually infected during the first months of life by several respiratory equine herpesviruses, such as EHV-1, EHV-4, EHV-2 or EHV-5. Horses could also be infected by EHV-3, responsible for equine coital exanthema. The persistence of these herpesviruses through establishment of latency, often characterised by an absence of clinical signs, represents a real risk to the horse population. EHV-1 is the most pathogenic among equid herpesviruses and is responsible for respiratory, abortive and neurological forms.



- Prevention of risk of reactivation and/or propagation:**
- ✓ Vaccines against EHV-1 and EHV-4, but coverage and efficacy remain insufficient
 - ✓ Reduce the risk of respiratory diseases
 - ✓ Limited or no effect against abortive and neurological forms
 - ✓ No vaccine against EHV-2, EHV-5 and EHV-3

- Therapeutic arsenal against EHV:**
- ✓ Limited against herpesviruses in equine specie
 - ✓ Importance of developing and testing new compounds with antiviral activity

Different conventional methods are commonly used for virus titration and infectivity studies. Most of them are based on direct examination of viral cytopathic effect, which is time consuming, tedious and requires an endpoint reading.

Objectives

- ✓ Evaluate the feasibility of using Real-Time Cellular Analysis system (RTCA system) to high-throughput screening of antiviral molecules against EHV
- ✓ Evaluate the antiviral effect of Acyclovir against the different α -EHV and γ -EHV

RTCA system (xCELLigence)

Dynamic monitoring of cell culture behaviour with Real-Time Cellular Analysis system (RTCA, ACEA Biosciences):

- ✓ Micro-electrical biosensor technology

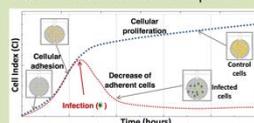


- ✓ Real-Time Analysis of 6 different 96-wells plates in parallel (continuous data)

- ✓ Repeated measurement of impedance to characterise the entire response:

- ✓ Early events
- ✓ Transitory events
- ✓ Late events

- ✓ Exceeds the end-point analyses



Materials and Methods

Equine dermal (ED) cells (CCL57, ATCC) were infected with:

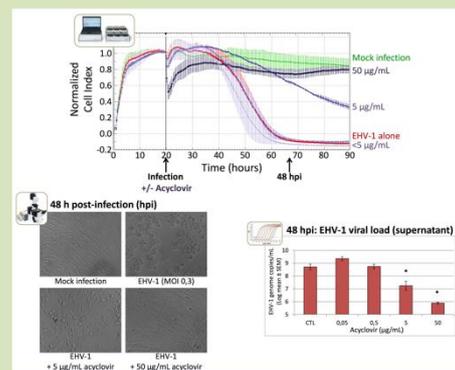
- ✓ EHV-1 (VR700)
- ✓ EHV-3 (VR352)
- ✓ EHV-1 A (isolate from abortion)
- ✓ EHV-4 (VR2230)
- ✓ EHV-2 (VR701)
- ✓ EHV-1 N (isolate from neurological forms)

The viral effects were monitored by 3 different methods:

- ✓ Impedance measurements (RTCA system, ACEA)
- ✓ Cytopathic effects recording (Eclipse TI microscope, Nikon)
- ✓ Viral load quantification (QuantStudio, Applied Biosystems)

Results

Anti-viral efficacy of Acyclovir against EHV-1



- ✓ Acyclovir ($\geq 5 \mu\text{g/ml}$) decrease EHV-1 effect in ED cells: decrease of Cell index, CPE formation and EHV-1 viral load.

Anti-viral efficacy of Acyclovir against different EHV

Methods	EHV-1	EHV-1 A	EHV-1 N	EHV-4	EHV-3	EHV-2
RTCA						
IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	12,8	12,0	11,5	3,6	26	*
qPCR						
IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	31,9	11,1	27,8	2,9	0,5	*

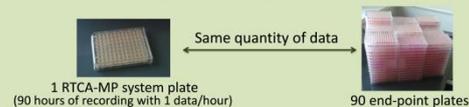
*: No effect

- ✓ Acyclovir decrease EHV-1 ($\geq 5 \mu\text{g/ml}$), EHV-4 ($\geq 2,5 \mu\text{g/ml}$), EHV-3 ($\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$) effects in ED cells.
- ✓ No effect was observed with EHV-2 in ED cells.

Conclusion

Cellular impedance monitoring system (xCELLigence, RTCA system):

- ✓ New real-time method to follow cell growth and viral proliferation
- ✓ Adapted to study EHV infection in equine dermal cells
- ✓ Adapted for high-throughput screening of antiviral molecules on EHV.



Acyclovir and EHV :

- ✓ Antiviral effect against EHV-1, EHV-4 and EHV-3 (alphaherpesviruses) in ED.
- ✓ No effect against EHV-2 (gammaherpesvirus) in ED.



Suivi en temps réel par impédancemétrie de l'infection des cellules dermiques équine par les herpesvirus équins: effet de l'acyclovir

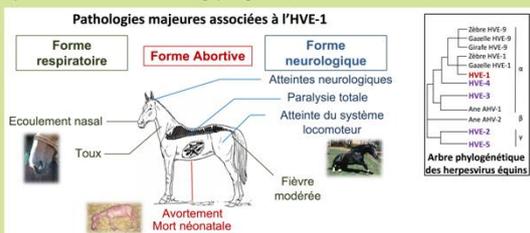
E. Hue^{1,2,3}, C. Thieulent^{1,2,3}, C. Fortier^{1,2,3}, P. Suzanne^{3,4}, S. Zientara⁵, A. Hans⁶, H. Munier-Lehmann⁷, P.-O. Vidalain⁸ and S. Pronost^{1,2,3}

¹ LABÉO Frank Duncombe, Caen, France; ² Equipe BioTARGen, EA 7450, Caen, France; ³ Normandie Université, Caen, France; ⁴ Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Caen, France; ⁵ Anses UMR 1161 Virologie, Maisons-Alfort, France; ⁶ Anses, Unité de Virologie, Dozulé, France; Institut Pasteur, Paris, France; ⁷ CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, Paris, France



Introduction

Les chevaux sont couramment infectés durant les premiers mois de leur vie par différents virus respiratoires tels que les herpesvirus équins: herpesvirus équin de type 1 (HVE-1), HVE-4, HVE-2 ou HVE-5. Ils peuvent également être infectés par l'HVE-3, responsable de l'exanthème coïtal équin. La persistance de ces virus à l'état latent dans l'organisme de l'animal, souvent caractérisée par une absence de signe clinique, représente un risque réel pour la population équine. HVE-1 est le plus pathogène des herpesvirus équins. Il est responsable de formes respiratoires, abortives et neurologiques graves.



Prévention des risques de réactivation et/ou propagation:
 ✓ Il existe des vaccins contre HVE-1 et HVE-4: la couverture et l'efficacité restent insuffisantes. On observe:
 - Une réduction du risque pour les maladies respiratoires
 - Des effets limités ou inexistantes sur les formes abortives et neurologiques
 ✓ Pas de vaccins contre HVE-2, HVE-5 et HVE-3.

Arsenal thérapeutique contre les HVE:
 ✓ Limité contre les herpesvirus pour l'espèce équine.
Importance de développer et tester de nouveaux composés avec des activités antivirales.
 Différentes méthodes conventionnelles sont communément utilisées pour le titrage de suspensions virales et les études d'infectiologie. La plupart d'entre elles sont basées sur un examen direct des effets cytopathiques viraux, elles sont longues et fastidieuses et requièrent une lecture en point final. Nous proposons dans ce travail, une nouvelle approche par impédancemétrie.

Objectifs

- ✓ Evaluer la faisabilité d'utiliser le Real-Time Cellular Analysis system (RTCA system) pour du screening à haut débit de molécules antivirales contre les HVE.
- ✓ Evaluer l'effet antiviral de l'acyclovir contre les différents α -HVE and γ -HVE.

Système RTCA (xCELLigence)

Enregistrement dynamique du comportement cellulaire avec le xCELLigence ou Real-Time Cellular Analysis system (RTCA, ACEA Biosciences):

- ✓ Technologie avec des biocapteurs micro-électriques.

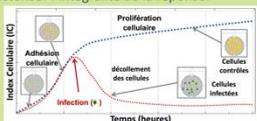


- ✓ Analyse en temps réel de 6 plaques 96-puits en parallèle (data en continu).

- ✓ Mesures répétées d'impédance pour caractériser l'intégralité de la réponse:

- ✓ Evénements précoces
- ✓ Evénements transitoires
- ✓ Evénements tardifs

- ✓ Dépasse les analyses en point final

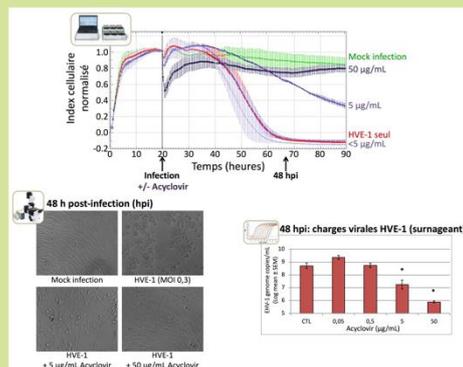


Matériels et Méthodes

- Cellules équine dermiques (ED) (CCL57, ATCC) infectées par:
- ✓ HVE-1 (VR700)
 - ✓ HVE-1 A (isolat L-FD suite à un avortement)
 - ✓ HVE-1 N (isolat L-FD suite à des troubles neurologiques)
 - ✓ HVE-4 (VR2230)
 - ✓ HVE-3 (VR352)
 - ✓ HVE-2 (VR701)
- Les effets viraux sont mesurés par 3 méthodes différentes:
- ✓ Mesures d'impédance (RTCA system, ACEA)
 - ✓ Enregistrement des effets cytopathiques (microscope Eclipse Ti, Nikon)
 - ✓ Quantification des charges virales (QuantStudio, Applied Biosystems)

Résultats

➤ Efficacité antivirale de l'acyclovir contre l'HVE-1



- ✓ L'acyclovir ($\geq 5 \mu\text{g/ml}$) diminue l'effet de l'HVE-1 sur les cellules ED: diminution de l'index cellulaire, de la formation des ECP et des charges virales HVE-1.

➤ Efficacité antivirale de l'acyclovir contre différents HVE

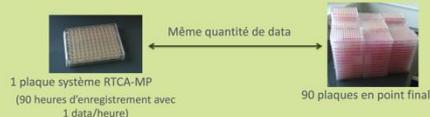
Méthodes	HVE-1	HVE-1 A	HVE-1 N	HVE-4	HVE-3	HVE-2
RTCA (IC50 $\mu\text{g/ml}$)	12,8	12,0	11,5	3,6	26	*
qPCR (IC50 $\mu\text{g/ml}$)	31,9	11,1	27,8	2,9	0,5	*

- *: Pas d'effet
- ✓ L'acyclovir diminue les effets de l'HVE-1 ($\geq 5 \mu\text{g/ml}$), l'HVE-4 ($\geq 2,5 \mu\text{g/ml}$), l'HVE-3 ($\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$) sur les cellules ED.
- ✓ Aucun effet de l'acyclovir n'est observé avec l'HVE-2 sur les cellules ED.

Conclusion

Système de suivi d'impédance cellulaire (xCELLigence, RTCA system):

- ✓ Nouvelle méthode en temps réel du suivi de la croissance cellulaire et de l'activité virale.
- ✓ Adapté à l'étude de l'infection des cellules équine dermiques par les HVE.
- ✓ Adapté au screening haut-débit de molécules antivirales contre les HVE.



Acyclovir et HVE :

- ✓ Effet antiviral contre HVE-1, HVE-4 et HVE-3 (alphaherpesvirus) sur cellules ED.
- ✓ Pas d'effet contre HVE-2 (gammaherpesvirus) sur modèle de cellules ED.



XIX^e Journées Francophones de Virologie
 20-21 Mars 2015, Institut Pasteur Paris
 Poster n°46
 Contact: Erika.Hue@laboratoire-labeo.fr



Impedance monitoring of Equid herpesviruses infectivity in equine dermal cell after acyclovir treatment

E. Hue^{1,2,3}, C. Thieulent^{1,2,3}, C. Fortier^{1,2,3}, P. Suzanne^{3,4}, S. Zientara⁵, A. Hans⁶, H. Munier-Lehmann⁷, P-O. Vidalain⁸ and S. Pronost^{1,2,3}

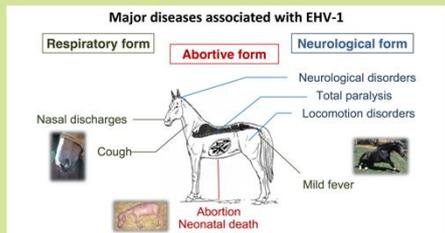
¹ LABÉO Frank Duncombe, Caen, France; ² Equipe BioTARGen, EA 7450, Caen, France; ³ Normandie Université, Caen, France; ⁴ Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Caen, France; ⁵ Anses UMR 1161 Virologie, Maisons-Alfort, France; ⁶ Anses, Unité de Virologie, Dozulé, France; ⁷ Institut Pasteur, Paris, France; ⁸ CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, Paris, France



Photography: C. Daik ©

Introduction

Horses are usually infected during the first months of life by several respiratory equine herpesviruses, such as EHV-1, EHV-4, EHV-2 or EHV-5. Horses could also be infected by EHV-3, responsible for equine coital exanthema. The persistence of these herpesviruses through establishment of latency, often characterised by an absence of clinical signs, represents a real risk to the horse population. EHV-1 is the most pathogenic among equid herpesviruses and is responsible for respiratory, abortive and neurological forms.



Prevention of risk against reactivation and/or propagation of EHV:

- ✓ Vaccines against EHV-1 and EHV-4, but coverage and efficacy remain insufficient
 - Reduce the risk of respiratory diseases
 - Limited or no effect against abortive and neurological forms
- ✓ No vaccine exist against EHV-2, EHV-5 and EHV-3.

Therapeutic arsenal against EHV:

- ✓ Limited against herpesviruses in equine specie

Importance of developing and testing new compounds with antiviral activity.

Different conventional methods are commonly used for virus titration and infectivity studies. Most of them are based on direct examination of viral cytopathic effect, which is time consuming, tedious and requires an endpoint reading.

Objectives of the study

- ✓ Evaluate the feasibility of using Real-Time Cellular Analysis system (RTCA system) to high-throughput screening of antiviral molecules against EHV.
- ✓ Evaluate the antiviral effect of Acyclovir against the different α -EHV and γ -EHV.

RTCA system (xCELLigence)

Dynamic monitoring of cell culture behaviour with xCELLigence or Real-Time Cellular Analysis system (RTCA, ACEA Biosciences):

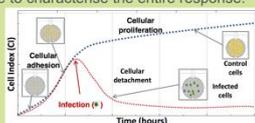
- ✓ Micro-electrical biosensor technology.



- ✓ Real-Time Analysis of 6 different 96-wells plates in parallel (continuous data).

- ✓ Repeated measurement of impedance to characterise the entire response:
 - ✓ Early events
 - ✓ Transitory events
 - ✓ Late events

- ✓ Exceeds the end-point analyses



Materials and Methods

Equine dermal (ED) cells (CCL57, ATCC) were infected with:

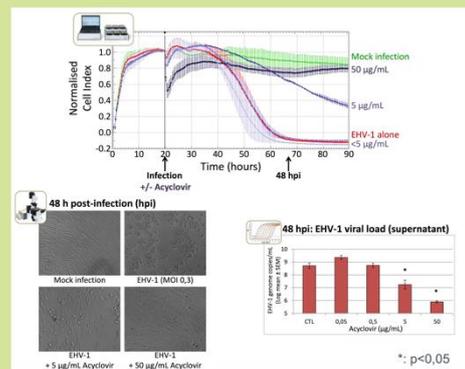
- ✓ EHV-1 (VR700)
- ✓ EHV-1 A (isolate L-FD from abortion)
- ✓ EHV-1 N (isolate L-FD from neurological forms)
- ✓ EHV-4 (VR2230)
- ✓ EHV-3 (VR352)
- ✓ EHV-2 (VR701)

The viral effects were monitored by 3 different methods:

- ✓ Impedance measurements (RTCA system, ACEA)
- ✓ Cytopathic effects recording (Eclipse Ti microscope, Nikon)
- ✓ Viral load quantification (QuantStudio, Applied Biosystems)

Results

➤ Anti-viral efficacy of Acyclovir against EHV-1



- ✓ Acyclovir ($\geq 5 \mu\text{g/ml}$) decrease EHV-1 effect in ED cells: decrease Cell index, CPE formation and EHV-1 viral load were observed.

➤ Anti-viral efficacy of Acyclovir against different EHV

Methods	EHV-1	EHV-1 A	EHV-1 N	EHV-4	EHV-3	EHV-2
RTCA IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	12,8	12,0	11,5	3,6	26	*
qPCR IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	31,9	11,1	27,8	2,9	0,5	*

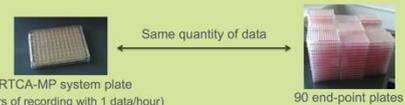
*: No effect

- ✓ Acyclovir decrease EHV-1 ($\geq 5 \mu\text{g/ml}$), EHV-4 ($\geq 2,5 \mu\text{g/ml}$) and EHV-3 ($\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$) effects in ED cells.
- ✓ No effect was observed with EHV-2 in ED cells.

Conclusion

Cellular impedance monitoring system (xCELLigence, RTCA system) is:

- ✓ A new real-time method to follow cell growth and viral proliferation.
- ✓ Adapted to study EHV infection in equine dermal cells.
- ✓ Adapted for high-throughput screening of antiviral molecules on EHV.



Acyclovir and EHV :

- ✓ Antiviral effect against EHV-1, EHV-4 and EHV-3 (alphaherpesviruses) in ED cells.
- ✓ No effect against EHV-2 (gammaherpesvirus) in ED cells.



42nd Annual international herpesvirus workshop, 2017
 ESVM Veterinary Herpesvirus Symposium 2017
 Contact: Erika.Hue@laboratoire-labeo.fr



REAL-TIME MONITORING OF EQUID ALPHAHERPESVIRUSES INFECTIVITY IN EQUINE DERMAL CELL BASED ON IMPEDANCE MEASUREMENTS

EFFECTS OF ACICLOVIR AND GANCICLOVIR TREATMENTS

Introduction

Horses are usually infected during the first months of life by several herpesviruses. Among them, three belong to the *Alphaherpesvirinae* subfamily (equine herpesvirus-1, EHV-4 and EHV-3).

- **EHV-1** is the most pathogenic and causes respiratory diseases in young horses, abortion in mares, neonatal death and neurological diseases.
- **EHV-4** is closely related to EHV-1 but mostly causes respiratory diseases, with sporadic abortion cases described.
- **EHV-3** is responsible for equine coital exanthema, characterized by formation of papules, pustules, ulcers and vesicles on the external genitalia.

The persistence of these herpesviruses through establishment of latency, often characterized by an absence of clinical signs, represents a real risk to the horse population.

PREVENTION & TREATMENTS



- Vaccines against **EHV-1** and **EHV-4**
 - Reduce the risk of respiratory diseases
 - Limited effect against abortive and no claim against neurological forms
 - Coverage and efficacy remain insufficient
- No vaccine exists against **EHV-3**

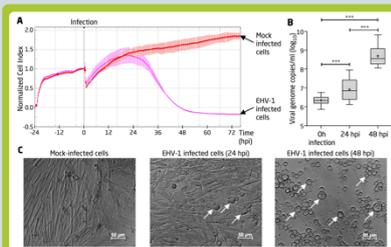


- Therapeutic arsenal against EHV is limited
- No antiviral drugs** has a marketing authorization for equine species

Importance of developing and testing new compounds against EHV with antiviral activity

C. Thieulent^{1,2}, E. Hue^{1,2,3}, C. Fortier^{1,2,3}, P. Suzanne⁴, S. Zientara⁵, H. Munier-Lehmann⁶, A. Hans⁷, P.-H. Pitel¹, P.-O. Vidalain⁸ and S. Pronost^{1,2,3}

¹ LABÉO, France; ² BIOTARGEN EA 7450, Normandie Univ, France; ³ Plateforme ImpedanCELL, SF 4206 ICORE, Normandie Univ, Caen, France; ⁴ Centre d'Études et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ, France; ⁵ Anses, Université Paris-Est, Laboratoire de Santé Animale, UMR 1161 Virologie, France; ⁶ Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, Paris, France; ⁷ Anses, Laboratoire de pathologie équine de Dozulé, Unité de virologie, France; ⁸ CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, France.



Effect of EHV-1 KyD strain on E. Derm cells.

- The decrease in the normalized Cell Index (CI) values is negatively correlated to the number of EHV-1 copies genome.
- The decrease in the normalized CI values is associated with formation of virus-mediated cytopathic effect.
- RTCA system is suitable for real-time monitoring of EHV-1 cytopathogenicity.

Mat & Meth

Equine dermal (E. Derm) cells (CCL57, ATCC) infected with:

- **EHV-1** (KyD, ATCC[®])
- **EHV-1** FR-6815 (isolate from abortion)
- **EHV-1** FR-3899 (isolate from neurological forms)
- **EHV-4** (405/76; ATCC[®])
- **EHV-3** (1118; ATCC[®])

- **Impedance measurements** (xCELLigence[®] Real-Time Cellular Analysis system, ACEA)
- **Viral load quantitation** (QuantStudio, Applied Biosystems)
- **Cytopathic effects recording** (Eclipse Ti microscope, Nikon)

(A) Real-time monitoring by RTCA of E. Derm cells proliferation and EHV-1 cytopathogenicity induced. (B) Viral genome copies of EHV-1 measured by qPCR assays (****; P < 0.001). (C) Microscopic monitoring of EHV-1 infection. White arrows indicate cytopathogenic effects induce by EHV-1.

Results

Susceptibility of different EHV to antiviral compounds measured by RTCA at 48 hpi.

Viruses	strains	EC ₅₀ ± SD (µg/ml)	
		ACV	GCV
EHV-1	KyD	9.88 ± 2.14	0.62 ± 0.49
	FR-6815	10.67 ± 2.15	1.32 ± 0.44
EHV-4	FR-3899	10.30 ± 3.15	1.11 ± 0.52
	405/76	17.38 ± 5.95	2.79 ± 0.25
EHV-3	1118	15.23 ± 2.85	1.86 ± 0.46

EC₅₀: 50% effective concentration

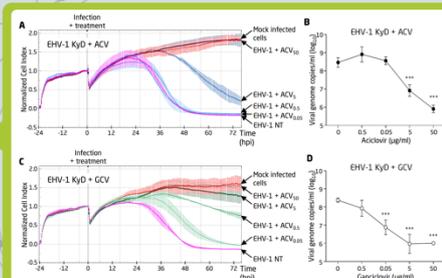
RTCA is a useful tool for real-time monitoring of EHV cytopathogenic effect on equine dermal cells.

ACV and GCV are effective antiviral compounds against EHV-1, EHV-4 and EHV-3.

GCV was 10 fold more effective than ACV against EHV-1, EHV-4 and EHV-3.

RTCA is appropriate for screening antiviral compounds against EHV.

Conclusions



Real-time monitoring of E. Derm cells infected by EHV-1 in presence of ACV (A) or GCV (C) measured by RTCA. Viral genome copies of EHV-1 measured by qPCR assays in presence of ACV (B) or GCV (D) (***; P < 0.001). NT: not treated.

Effects of aciclovir (ACV) and ganciclovir (GCV) on E. Derm cells infected by EHV-1 (KyD).

- High concentrations of ACV and GCV keep the CI similar to mock infected cells, whereas lower concentrations limit the CI decrease induced by EHV-1 or show no antiviral effect.
- GCV seems more efficient than ACV to prevent the EHV-1 cytopathogenic effect.
- Dose-dependent antiviral effects of ACV and GCV were confirmed by qPCR assays.
- Similar results were obtained for EHV-4 and EHV-3.

IBCA 2018 4th Conference on Impedance-Based Cellular Assays, June 6th-8th, Edinburg, Scotland, 2018

Partners :

Fundings :

Contact : come.thieulent@laboratoire-labeo.fr



<https://impedancell.fr/>

Auteurs : Gabrielle Sutton^{1,2}, Côte Thieulent^{1,2}, Christine Fortier^{1,2}, Baptiste Mulot³, Romain Paillot^{1,2}, Loïc Legrand^{1,2}, Antoine Leclerc³, Stéphane Pronost^{1,2}

¹LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France.
²Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450, 14280 Saint-Contest, France.
³ZooParc de Beauval & Beauval Nature, 41110 Saint-Aignan.

Confirmation d'infections mortelles par HVE-9 chez des zèbres de Grévy en captivité



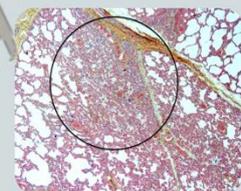
(Crédit photo: Antoine Leclerc)

Nasaux de zèbre présentant un écoulement nasal.

INTRODUCTION

- Neuf types d'herpèsvirus sont classiquement décrits chez les équidés :
 - ⇒ chez les chevaux : herpèsvirus équin (HVE)-1,3,4 pour les alphaherpèsvirus et HVE-2,5 pour les gammaherpèsvirus.
 - ⇒ chez les ânes : HVE-6 et 8 pour les alphaherpèsvirus et HVE-7 pour les gammaherpèsvirus.
 - ⇒ l'HVE-9 initialement isolé chez une Gazelle de Thomson.
- Même si la majorité de ces herpèsvirus sont connus pour avoir une spécificité d'hôtes, certains d'entre eux semblent avoir franchi la barrière d'espèce comme c'est le cas pour l'HVE-1 et l'HVE-9, retrouvés chez plusieurs espèces d'animaux sauvages (gazelles, zèbres, rhinocéros).

Objectif : Confirmer l'infection de trois zèbres de Grévy ayant montré des signes cliniques respiratoires et neurologiques entraînant la mort d'un mâle de 16 mois et d'une femelle de 2 mois.



(Crédit photo: Antoine Leclerc)

Fibronécrose interstitielle pulmonaire
 Histologie de poumon après autopsie.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Isolement du virus:

- Broyage du poumon du zèbre mâle de 16 mois.
- Isolement sur cellules RK13, lignée cellulaire fréquemment utilisée pour la culture d'HVE.

Détection des herpèsvirus:

- Extraction d'acides nucléiques (poumon et souche isolée) à l'aide du QIAmp® DNA et Viral RNA Mini Kit (Qiagen).
- Réalisation d'une PCR consensuelle pour la détection d'herpèsvirus chez les mammifères (VanDevanter *et al.* 1996).

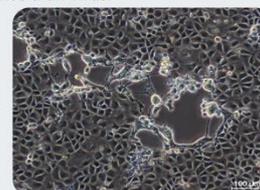
Typage des herpèsvirus:

- Séquençage des ORF30 et ORF33 par méthode Sanger.
- Arbre phylogénétique réalisé selon la méthode Maximum Composite Likelihood.



RÉSULTATS

- Un effet cytopathogène a été observé sur les cellules mises en culture en présence du broyat de poumon du mâle de 16 mois attestant de la présence d'un virus.



(Crédit photo: LABÉO)

- La PCR de détection a permis d'identifier un herpèsvirus de mammifère.
- L'homologie de 99% de la séquence obtenue, à partir du poumon, avec celle de la souche d'HVE-9 de référence AP010838.1 (référence Pubmed) révèle la présence d'HVE-9 chez ce zèbre.
- La mutation G, dite neuropathogène, en position 2254 de l'ORF30 a été mise en évidence par séquençage.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats *in vitro* suggèrent que l'HVE-9 est à l'origine de l'épisode neurologique observé chez les zèbres de Grévy.

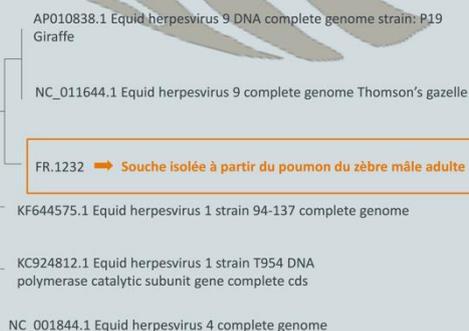
Il s'agit du premier cas mortel lié à l'HVE-9 chez des zèbres de Grévy en France. La présence de la mutation G2254 pose la question d'une pathogénicité accrue de cette souche.

Perspectives : Le franchissement de la barrière d'espèce de cette souche chez les mammifères rend nécessaire sa surveillance chez les équidés.

De plus, l'isolement de la souche permettra :

- L'étude des mécanismes de pathogénicité de ce virus.
- L'évaluation de l'efficacité de molécules antivirales.

Arbre phylogénétique situant la souche isolée parmi 2 souches d'HVE-1, 2 souches d'HVE-9 et 1 souche d'HVE-4.



Contact: Gabrielle Sutton
 gabrielle.sutton@laboratoire-labeo.fr



Financements:

Fonds Éperon



CRIBLAGE ET ÉVALUATION DE L'EFFET ANTIVIRAL DE MOLÉCULES CONTRE LES HERPÈSVIRUS ÉQUINS 1 ET 4 PAR LA MESURE D'IMPÉDANCE CELLULAIRE : EFFET DE LA SPIRONOLACTONE

C. Thieulent^{1,2}, E. Hue^{1,2,3}, C. Fortier^{1,2,3}, P. Suzanne⁴, S. Zientara⁵, H. Munier-Lehmann⁶, A. Hans⁷, P.-H. Pitel¹, P.-O. Vidalain⁸ and S. Pronost^{1,2,3}

¹ LABÉO, France; ² BIOTARGEN EA 7450, Normandie Univ, France; ³ Plateforme ImpedanCELL, SF 4206 ICORE, Normandie Univ, Caen, France; ⁴ Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ, France; ⁵ Anses, Université Paris-Est, Laboratoire de Santé Animale, UMR 1161 Virologie, France; ⁶ Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, Paris, France; ⁷ Anses, Laboratoire de pathologie équine de Dozulé, Unité de virologie, France; ⁸ CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, France.



Introduction

Les herpesvirus équins 1 (HVE-1) et 4 (HVE-4) appartiennent à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. Ces virus sont les pathogènes responsables des plus fortes pertes économiques pour la filière équine en France, comme le montre l'épidémie de 2018 avec plus de 72 foyers infectieux et 210 compétitions équestres annulées.

- Trois formes distinctes de la maladie sont décrites chez l'HVE-1 avec différents symptômes :
 - La **forme respiratoire** caractérisée par de la toux, de la fièvre et des écoulements nasaux.
 - La **forme abortive** avec l'avortement du fœtus ou une mort néo-natale
 - La **forme nerveuse**, également appelée myéloencéphalopathie, nécessitant l'euthanasie de l'animal dans plus de 50% des cas.

L'HVE-4 provoque principalement des **troubles respiratoires** et des avortements de façon sporadique.

PREVENTION & TRAITEMENTS



Vaccination → Réduit les troubles respiratoires
Effet limité contre les avortements et aucun effet contre la forme nerveuse
Couverture vaccinale insuffisante

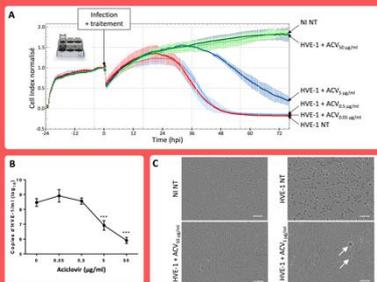


L'arsenal thérapeutique contre l'HVE-1 et l'HVE-4 est limité.
Aucune molécule antivirale ne possède d'autorisation de mise sur le marché en santé équine.

→ Il est important de développer de nouveaux composés ou de repositionner des composés efficaces contre les HVE.

Résultats

I) Mise en place de la technologie xCELLigence pour le suivi en temps réel de la formation d'ECP sur les cellules équines dermiques (E. Derm) provoquée par l'HVE-1.



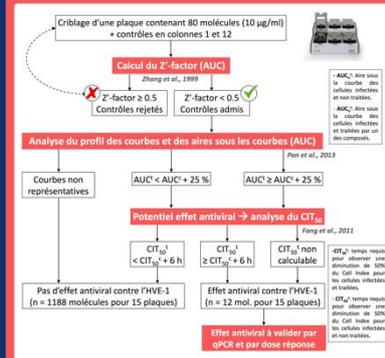
(A) Suivi en temps réel par la technologie xCELLigence des cellules E. Derm infectées par l'HVE-1 en présence d'aciclovir (ACV). La courbe verte représente le Cell Index au cours du temps des cellules non infectées et non traitées (NI NT), la courbe rouge représente le Cell Index au cours du temps des cellules infectées par l'HVE-1 et non traitées (HVE-1 NT) et les courbes en dégradé de bleu représentent le Cell Index au cours du temps des cellules infectées par l'HVE-1 et traitées avec différentes concentrations d'ACV. (B) Nombre de copies d'HVE-1 mesuré par qPCR en présence d'ACV 48 heures post-infection (hpi) (***) : $p < 0,001$. (C) Observations au microscope de l'infection des cellules E. Derm par l'HVE-1. Les flèches blanches indiquent les effets cytopathogènes (ECP) (échelle : 100 µm).

- La diminution du Cell Index est inversement corrélée à l'augmentation du nombre de copies génomes d'HVE-1 et à la formation d'ECP induits par l'HVE-1.
- Une forte concentration d'ACV maintient une valeur de Cell Index comparable aux cellules contrôles et une concentration intermédiaire retarde fortement la chute du Cell Index.
- L'ACV est capable de contrer la formation d'ECP induits par l'HVE-1. Une EC_{50} de 9,88 µg/ml est déterminée avec l'appareil xCELLigence.

Cellules équines dermiques (E. Derm; CCL57TM, ATCC[®]) infectées par :

- HVE-1 (VR-700; ATCC[®])
- HVE-4 (VR-2230; ATCC[®])

II) Création d'un arbre décisionnel pour le criblage de molécules antivirales contre l'HVE-1 en utilisant la technologie xCELLigence.



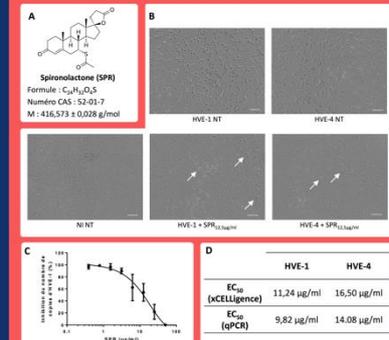
- Arbre décisionnel pour analyser les résultats d'un criblage d'une banque de 1200 molécules contre l'HVE-1 dans un format 96 puits. 80 composés sont testés par plaque et les contrôles sont déposés dans les colonnes 1 et 12. Le **Z-factor** est calculé à partir des résultats d'aires sous les courbes des contrôles (AUC). Les courbes non représentatives correspondent aux contrôles avec une diminution de Cell Index précoce (effet cytotoxique). Le CIT_{50} correspond au temps requis pour observer une diminution de 50% du Cell Index pour les cellules infectées (Fang et al., 2011).
- Suite au criblage à l'aveugle de la banque Prestwick[®], 12 molécules ont montré un effet antiviral contre l'HVE-1.
- Parmi ces 12 composés, nous avons retrouvé l'ACV, ce qui confirme la pertinence de notre système.
- Nous avons identifié la spironolactone (SPR) comme molécule présentant un effet antiviral contre l'HVE-1.

Mesure d'impédance cellulaire (xCELLigence[®] Real-Time Cellular Analysis system, ACEA)

Quantification des charges virales (QuantStudio, Applied Biosystems)

Observation des effets cytopathogènes (Eclipse Ti microscope, Nikon)

III) Identification de la Spironolactone (SPR) comme molécule antivirale efficace contre les HVE-1 et HVE-4 suite au criblage de la chimiothèque Prestwick[®].



- (A) Structure de la SPR. (B) Observations au microscope de l'infection des cellules E. Derm par les HVE-1 et HVE-4 en présence de SPR. Les flèches blanches indiquent les effets cytopathogènes (ECP) (échelle : 200 µm). (C) Courbe dose-réponse de l'effet antiviral de la SPR contre l'HVE-1 mesurée par qPCR 48 hpi. (D) Susceptibilités des HVE-1 et HVE-4 à la SPR mesurées par xCELLigence et par qPCR 48 hpi (EC_{50} : Concentration efficace médiane).
- La SPR est capable de contrer l'apparition d'ECP induits par l'HVE-1 et l'HVE-4.
- L'HVE-1 semble plus sensible à la SPR que l'HVE-4.
- À 48 heures post-infection, la SPR montre un effet antiviral comparable à celui de l'ACV contre l'HVE-1 et l'HVE-4.

Conclusions

- La technologie xCELLigence permet un suivi en temps réel de l'apparition d'effets cytopathogènes (ECP) et d'évaluer l'effet de molécules antivirales.
- La technologie xCELLigence peut être utilisée pour le criblage à moyen/haut débit de molécules antivirales contre les herpesvirus équins grâce à des calculs d'aire sous la courbe (AUC) et de temps requis pour observer une diminution de 50% du Cell Index (CIT_{50}).
- L'HVE-1 et l'HVE-4 ont une sensibilité à la spironolactone comparable à l'aciclovir. L'effet antiviral de la spironolactone a déjà été démontré contre le virus d'Epstein-Barr (Verma et al., 2016) et contre les VIH-1 et VIH-2 (Lacombe et al., 2016).
- Ces résultats montrent que la spironolactone a un effet antiviral à large spectre et pourrait potentiellement être utilisée pour lutter contre un plus grand nombre de virus.

<https://impedancell.fr/>

Remerciement : E. Brotin
C. Denoyelle

Partenaires :

Financements :

Contact : come.thieulent@laboratoire-labeo.fr



Le ganciclovir, pour traiter la rhinopneumonie demain ?



C.Thieulent^{1,2}, E. Hue^{1,2,3}, C. Fortier^{1,2,3}, P. Dallemagne⁴, S. Zientara⁵, A. Hans⁶, H. Munier-Lehmann⁷, P.-O. Vidalain⁸ et S. Pronost^{1,2,3}

¹ LABÉO, France; ² BIOTARGEN EA 7450, Normandie Univ, France; ³ Plateforme ImpedanCELL, SF 4206 ICORE, Normandie Univ, Caen, France; ⁴ Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, Normandie Univ, France; ⁵ Anses, Université Paris-Est, Laboratoire de Santé Animale, UMR 1161 Virologie, France; ⁶ Anses, Laboratoire de pathologie équine de Dozulé, Unité de virologie, France; ⁷ Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, Paris, France; ⁸ CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, France.



Introduction

Les herpesvirus équins 1 (HVE-1) et 4 (HVE-4) sont responsables de la rhinopneumonie équine.

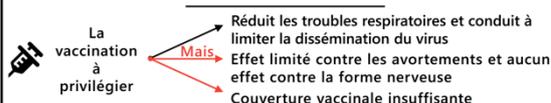
Ce sont des pathogènes responsables de **pertes économiques très importantes** pour la filière équine.

2018 : 74 foyers infectieux et plus de 210 compétitions équestres annulées (source : RESPA).

Trois formes distinctes de la maladie sont décrites chez l'HVE-1 :

- La **forme respiratoire** caractérisée par de la toux, de la fièvre et des écoulements nasaux.
- La **forme abortive** avec l'avortement du fœtus ou une mort-néonatale.
- La **forme nerveuse**, également appelée myéloencéphalopathie à HVE-1, nécessite l'euthanasie de l'animal dans plus de 50% des cas.

L'HVE-4 provoque principalement des troubles respiratoires et des avortements de façon sporadique.



Aucune molécule antivirale ne possède d'autorisation de mise sur le marché en santé équine malgré des besoins importants.

L'aciclovir est la seule molécule ayant fait l'objet d'études expérimentales sur des chevaux infectés par l'HVE-1, sans donner de résultats très probants.

Lors de cette étude nous étudions *in vitro* l'effet du ganciclovir, un autre antiviral utilisé en médecine humaine, et qui n'a pas encore fait l'objet d'études chez le cheval.

Mat. & Meth.

Les **cellules équines dermiques** (E. Derm; CCL57TM; ATCC[®]) ont été infectées par **une souche d'HVE-4 (VR2230TM; ATCC[®])** et **trois souches d'HVE-1 :**

- HVE-1 KyD (VR700TM; ATCC[®]) : souche de référence
- HVE-1 FR-6815 : isolée sur un fœtus avorté en 2013
- HVE-1 FR-38991 : isolée d'un cheval présentant des troubles nerveux en 2009

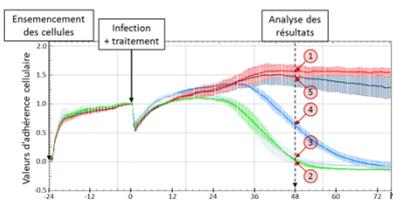
Le criblage des 1200 molécules provenant de la **banque Prestwick[®]** a été réalisé sur la souche HVE-1 KyD grâce à la technologie xCELLigence[®] (mesure de l'adhérence cellulaire).

L'effet antiviral des molécules retenues a été **confirmé par microscopie** et **par quantification des copies d'ADN viral** dans le surnageant (qPCR).

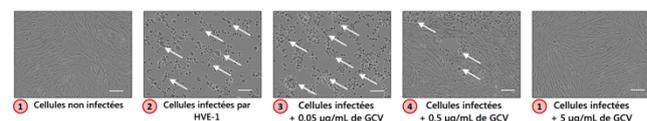
Résultats

I- Identification du ganciclovir comme molécule anti-HVE-1 parmi une banque de 1200 molécules.

- Le criblage à l'aveugle de la banque Prestwick[®] a mis en évidence 12 molécules avec de potentiels effets antiviraux contre l'HVE-1. Ces molécules ont été testées en dose-réponse.
- Le **ganciclovir** est la molécule présentant le **meilleur effet antiviral** contre l'HVE-1.



Suivi en temps réel par la technologie xCELLigence de l'adhérence des cellules E. Derm infectées par l'HVE-1 en présence de ganciclovir. Les courbes verte et rouge représentent les niveaux d'adhérence au cours du temps des cellules non infectées et non traitées (1) et des cellules infectées par l'HVE-1 et non traitées (2), respectivement. Les courbes en dégradé de bleu représentent le niveau d'adhérence des cellules infectées par l'HVE-1 et traitées avec des concentrations croissantes de ganciclovir (0,05 µg/ml (3), 0,5 µg/ml (4) et 5 µg/ml (5)).



Observation au microscope de l'infection des cellules équines dermiques par l'HVE-1 et traitées avec différentes concentrations de ganciclovir. Les flèches indiquent les altérations morphologiques des cellules induites par l'HVE-1, également appelées effets cytopathiques (échelle : 100 µm).

- Une concentration de **0,05 µg/ml** (3) de ganciclovir ne montre aucun effet antiviral et une concentration de **0,5 µg/ml** (4) retarde l'apparition d'effets cytopathiques induits par l'HVE-1.
- Une concentration de **5 µg/ml** (5) empêche l'apparition d'effets cytopathiques induits par l'HVE-1 et permet de maintenir le tapis cellulaire sain.

II- Confirmation de l'effet antiviral du ganciclovir contre plusieurs souches d'HVE-1 *in vitro*.

	Aciclovir	Ganciclovir
KyD	9,88 µg/mL	0,62 µg/mL
FR-6815	10,67 µg/mL	1,32 µg/mL
FR-38991	10,30 µg/mL	1,11 µg/mL

- Que ce soit pour l'aciclovir ou pour le ganciclovir, aucune différence de sensibilité n'est observée entre les 3 souches d'HVE-1.

- Le ganciclovir présente une efficacité comparable à l'aciclovir mais à des concentrations 10 fois inférieures.

Sensibilité de 3 souches d'HVE-1 à des traitements à l'aciclovir et au ganciclovir mesurée par la technologie xCELLigence à 48 heures post-infection. Les résultats représentent la moyenne des concentrations capables d'inhiber 50% de la réplication virale de 4 expériences indépendantes.

III- Validation *in vitro* de l'effet antiviral du ganciclovir contre l'HVE-4.

	Aciclovir	Ganciclovir
HVE-4	17,38 µg/mL	2,79 µg/mL

- Tout comme l'HVE-1, l'HVE-4 est sensible *in vitro* à un traitement au ganciclovir.

- L'HVE-4 est moins sensible au ganciclovir que l'HVE-1.

- Le ganciclovir permet d'obtenir, *in vitro*, des effets comparables à l'aciclovir contre l'HVE-1 mais à une concentration 6 fois inférieure.

Sensibilité de l'HVE-4 à des traitements à l'aciclovir et au ganciclovir mesurée par la technologie xCELLigence à 48 heures post-infection. Les résultats représentent la moyenne des concentrations capables d'inhiber 50% de la réplication virale de 4 expériences indépendantes.

Conclusions et perspectives

- Parmi 1200 molécules utilisées en médecine humaine, le **ganciclovir s'avère être la molécule présentant l'effet antiviral** le plus important contre l'HVE-1.
- L'HVE-1 et l'HVE-4 sont tous les deux sensibles à un traitement au ganciclovir *in vitro* et l'HVE-1 semble légèrement plus sensible à cette molécule que l'HVE-4.
- Les résultats devront être confirmés *in vivo* afin de mettre à disposition de la filière équine un traitement efficace contre les HVE-1 et HVE-4. Par ailleurs, la pharmacocinétique du ganciclovir a déjà été étudiée chez le cheval et présente des résultats encourageants.
- Nous envisageons de faire une **étude expérimentale sur des chevaux infectés par l'HVE-1** afin de mesurer l'effet antiviral du ganciclovir.

(1) 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.



come.thieulent@laboratoire-labeo.fr

Partenaires :



Financements :



JOURNÉES SCIENCES & INNOVATIONS ÉQUINES
23 & 24 MAI 2019 SAUMUR

Annexe 6 : Réalisations en parallèles des travaux de recherche

Prix du meilleur poster lors du congrès IBCA (Impedance-Based Cellular Assays) qui s'est tenu en 2018 à Edimbourg pour : « Real-Time monitoring of Equid alphaherpesviruses infectivity in equine dermal cell based on impedance measurements: effects of aciclovir and ganciclovir treatments ».

http://www.ibca2018.net/best_posters.html

Deuxième prix du jury pour ma présentation au concours national « Ma thèse en 180 secondes, section filière équine » organisé par l'IFCE en mars 2018 à Paris.

<https://www.youtube.com/watch?v=l1BtJZKjY34>

Membre du **Comité de Suivi Individuel** de Mylène Verney, doctorante (ANSES, Unité PhEED, Laboratoire de santé animale, site de Normandie, RD675, Goustranville).

Membre du **Conseil de Laboratoire** de l'unité BIOTARGEN (EA 7450).

Enseignements de cours d'immunologie et de culture cellulaire avec la technologie iCELLigence® aux étudiants de l'IUT de Caen en tant qu'agent temporaire vacataire durant l'année universitaire 2018-2019 (**total de 45 heures**).

Membre du **comité d'organisation** du premier « European Meeting of Equine Infectious Diseases » organisé par LABÉO le 29 novembre 2019 à Caen.

Participation aux **EQUIDAYS** organisés du mercredi 23 au dimanche 27 octobre 2019, pour présenter la plateforme « Normandie Equine Vallée ».

Participation au dispositif **Apprentis chercheurs** (L'Arbre des Connaissances) en encadrant deux étudiantes : Valentine Hébert, élève de 3^{ème} et Margaux Barrière, élève en 1^{er} scientifique, durant l'année scolaire 2018-2019.

CRIBLAGE *IN VITRO* DE MOLECULES ANTIVIRALES CONTRE L'HERPESVIRUS EQUIN 1 PAR IMPEDANCEMETRIE ET EVALUATION CLINIQUE DE L'EFFET DU VALGANCICLOVIR

MOTS CLEFS

Herpèsvirus équin 1 ; Cheval ; Antiviraux ; Criblage ; Impédancemétrie ; Infection expérimentale ; Valganciclovir ; Décitabine

RESUME

Neuf herpèsvirus sont connus pour infecter les équidés. Parmi eux, l'herpèsvirus équin 1 (HVE-1) induit les formes de la maladie les plus graves. En effet, ce virus provoque des troubles respiratoires, des avortements, des morts néonatales et des troubles nerveux qui mènent souvent à l'euthanasie de l'animal. La prophylaxie, reposant sur les bonnes pratiques sanitaires et la vaccination, demeure le meilleur moyen de lutte contre l'ensemble des herpèsvirus équins. Des vaccins qui réduisent efficacement les troubles respiratoires et la dissémination de l'HVE-1 ont été développés. Cependant, ces derniers ne préviennent pas les avortements et n'ont aucun effet démontré contre la forme nerveuse. De plus, la couverture vaccinale demeure insuffisante en France. Les traitements aux antiviraux constituent donc une approche complémentaire dans la lutte contre l'HVE-1. Cependant, trop peu d'études ont évalué l'effet de molécules contre ce virus, limitant les perspectives d'utilisation. Pour répondre à cette problématique, nous avons développé un protocole de criblage à moyen/haut débit à l'aide de la technologie RTCA xCELLigence®, basée sur la mesure d'impédance cellulaire. Suite au criblage de 2891 molécules, 21 candidats ont été identifiés pour leur efficacité contre l'HVE-1. Parmi ceux-ci, l'aphidicoline, la décitabine, le ganciclovir, l'idoxuridine, le pritelivir et le valganciclovir ont présenté les meilleurs effets. L'activité de ces molécules a été confirmée sur différents modèles cellulaires en présence de différentes souches d'HVE-1. Cette étude a conduit à l'identification et à l'étude du mode d'action d'une nouvelle molécule efficace contre l'HVE-1, la décitabine. Cet analogue de la déoxycytidine a également montré un effet synergique *in vitro* lorsqu'elle est associée au valganciclovir. Lors de la seconde phase de ce travail, nous avons testé l'efficacité d'un traitement au valganciclovir lors d'un challenge expérimental avec infection par nébulisation d'une souche d'HVE-1 (C₂₂₅₄) récemment isolée au cours de l'épizootie de 2018. Cette étude a permis de démontrer qu'une dose de 6,5 mg/kg de valganciclovir, administrée 2 fois par jour, permettait de maintenir un bon niveau de protection avant la mise en place de la réponse immunitaire humorale. En effet, ce traitement permet de réduire les signes cliniques, l'excrétion virale et la virémie cellulaire induits par l'HVE-1. Ces travaux réalisés *in vivo* démontrent l'efficacité du valganciclovir contre l'HVE-1 et le criblage réalisé *in vitro* ouvre de nouvelles perspectives de traitement, en particulier avec des associations de molécules.

KEYWORDS

Equid herpesvirus 1; Horse; Antiviral; Screening; Impedance; Experimental infection; Valganciclovir; Decitabine

ABSTRACT

Eight herpesviruses are known to infect the equine population. Among them, the equid herpesvirus 1 (EHV-1) induces the most severe forms of diseases. Indeed, this virus causes respiratory symptoms, abortions, neonatal foal deaths and nervous diseases, often leading to their euthanasia. Prophylaxis, relying on good sanitary practices and vaccination remains the best way to avoid epizooties of herpesviruses. Vaccines reducing efficiently respiratory disorders and EHV-1 dissemination are currently available. However, they do not prevent abortions and have no proven effect against nervous symptoms. In addition, the vaccine coverage is insufficient in France. Antiviral therapy is therefore an interesting complementary approach in the fight against EHV-1. However, there is a lack of studies evaluating the antiviral effect of compounds against EHV-1, limiting the prospects of use. To resolve this issue, we have developed a medium/high throughput screening protocol using the RTCA xCELLigence® technology based on cell impedance measurements. Following the screening of 2891 compounds, 21 candidates were identified for their efficacy against EHV-1. Among them, aphidicolin, decitabine, ganciclovir, idoxuridine, pritelivir and valganciclovir showed the best efficacy. The activity of these compounds was confirmed on different cell lines in the presence of different EHV-1 strains. This study led to the identification and the understanding of the mode of action of decitabine. This deoxycytidine analogue, also showed a synergistic effect when combined with valganciclovir. In the second part of this work, we evaluated the effect of valganciclovir treatment during an experimental infection by nebulisation with a new EHV-1 strain (C₂₂₅₄) recently isolated during the epizootic of 2018. This study demonstrated that a dose of 6.5 mg/kg body weight of valganciclovir, administrated orally twice a day, allowed to maintain a good protection prior the establishment of the humoral immune response. Indeed, this treatment allows to reduce significantly clinical signs, viral excretion and cell-associated viremia induced by EHV-1 on ponies. This work carried out *in vivo* demonstrated the efficiency of valganciclovir treatment against EHV-1, while the *in vitro* screening opens up new perspectives of treatment, in particular with compounds association.