



HAL
open science

Construction d'un herpèsvirus auto-fluorescent ANCHOR et développement de quantifications automatisées de l'effet cytopathique pour l'identification de molécules antivirales en médecine vétérinaire : application à l'herpèsvirus équin de type 1

Charlotte Quentin-Froignant

► **To cite this version:**

Charlotte Quentin-Froignant. Construction d'un herpèsvirus auto-fluorescent ANCHOR et développement de quantifications automatisées de l'effet cytopathique pour l'identification de molécules antivirales en médecine vétérinaire : application à l'herpèsvirus équin de type 1. Médecine vétérinaire et santé animale. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2021. Français. NNT : 2021INPT0058 . tel-04170231

HAL Id: tel-04170231

<https://theses.hal.science/tel-04170231v1>

Submitted on 25 Jul 2023

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme CHARLOTTE QUENTIN-FROIGNANT

le lundi 14 juin 2021

Titre :

Construction d'un herpèsvirus auto-fluorescent ANCHOR et développement de quantifications automatisées de l'effet cytopathique pour l'identification de molécules antivirales en médecine vétérinaire : application à l'herpèsvirus équin de type 1

École doctorale :

Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP)

Directeurs de Thèse :

M. STEPHANE BERTAGNOLI

M. FRANCK GALLARDO

Rapporteurs :

M. LAURENT GILLET, UNIVERSITE DE LIEGE

M. PATRICK LOMONTE, UNIVERSITE LYON 1

M. STÉPHAN ZIENTARA, ANSES

Membres du jury :

M. PIERRE CORDELIER, INSERM OCCITANIE PYRENEES, Président

M. FRANCK GALLARDO, NeoVirTech, Membre

M. MANUEL ROSA-CALATRAVA, UNIVERSITE LYON 1, Membre

MME SEVERINE BOULLIER, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. STEPHANE BERTAGNOLI, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury. Au professeur Laurent Gillet et aux docteurs Patrick Lomonte et Stéphane Zientara pour avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux et pour le temps consacré à l'évaluation de ce manuscrit. Au professeur Séverine Boullier et aux docteurs Pierre Cordelier et Manuel Rosa-Calatrava pour avoir accepté d'examiner cette thèse et de participer au jury. Merci à tous d'avoir bousculé vos emplois du temps pour permettre la soutenance de cette thèse.

A mon directeur de thèse, Stéphane Bertagnoli, pour avoir accepté de diriger cette thèse et pour ta confiance totale. Merci pour tes connaissances inépuisables, tes encouragements et ton optimisme à toute épreuve ! Merci d'avoir réussi à trouver le temps de m'accompagner dans ce projet malgré tes journées marathon « cours / TD / TP / réunions / conférences / cours ... » plus que remplies. J'espère que tu pourras désormais prendre un peu de temps pour toi !

A mon co-directeur de thèse, Franck Gallardo, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir accueillie chez NeoVirTech lorsque je suis venue frapper à ta porte après mon premier cours de virologie, et pour la confiance que tu m'as accordée lors de mes différents stages et tout au long de cette thèse. Merci pour tes connaissances et pour toutes les manip « faites maison ». Merci de t'être toujours rendu disponible lorsque j'en avais besoin, pour toutes les questions que je t'ai posées et auxquelles tu as toujours répondu, et pour les créneaux « questions idiotes » du lundi matin et du vendredi après-midi. Merci pour ton soutien et pour avoir toujours pris le temps de réfléchir avec moi aux problèmes rencontrés. Tout simplement, merci pour tout !

A mes collègues et amis de NeoVirTech. Merci à Sandrine et Kunta pour vos précieux conseils et toutes les discussions qui ont permis de faire avancer ce projet, et pour m'avoir soutenu tout le long de cette thèse. Merci également aux petits nouveaux : Elie, pour ta bonne humeur et tes blagues (tu peux redescendre mes cartes de visite maintenant :p) et Thomas pour ton expertise en de nombreux domaines de la virologie. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble et pour tous ceux à venir !

A l'ensemble de l'équipe virologie de l'IHAP, pour m'avoir accueillie avec mon petit virus à ADN. Merci aux membres du poulailler pour avoir toujours réussi à me faire une petite place pour poser mes affaires. Bon courage à tous pour vos thèses ! L'effort est rude mais ne lâchez rien !

Aux membres de mon comité de thèse, le professeur Jean-Luc Guérin et le docteur Harald Wodrich, pour leurs conseils avisés et pour avoir permis d'orienter ce projet dans la bonne direction.

A mes parents, Marie-Christine et Eric, pour l'éducation qu'ils m'ont donnée et qui a grandement contribué à m'amener jusqu'à cette thèse, et pour m'avoir toujours soutenue et accompagnée quels que soient mes choix.

A Sophie, mon petit criquet veinard (ou pas parfois :p), pour ton amitié et ton soutien sans faille depuis les bancs de la fac. Tu as toujours su me remonter le moral et trouver les mots pour me pousser à avancer et poursuivre cette thèse malgré les difficultés rencontrées. Merci pour avoir lu ce manuscrit et t'être replongée dans de vieux souvenirs et dans ta passion de la biologie moléculaire.

A Lauriane, pour avoir accepté de réduire nos sorties et nos discussions poney pendant quelques temps. Merci pour m'avoir remise en selle et m'avoir fait prendre confiance à cheval. A toutes nos futures balades et papotages au milieu du pré.

A l'amour de ma vie, Aurélien, pour m'avoir encouragée, soutenue et supportée pendant ces trois années qui n'ont pas toujours été faciles. Merci pour toutes tes petites attentions quotidiennes qui m'ont permis de me consacrer entièrement à l'écriture de ce manuscrit. Sans toi ce travail ne serait pas ce qu'il est. A toutes les futures années à tes côtés. Je t'aime !

A mes animaux de compagnie. Mon Choupi-Chat pour m'avoir tenu compagnie durant les longues journées d'écriture (même si tu dormais dans 99,99% du temps) et mon Gros Poney pour m'avoir permis de me vider l'esprit et de prendre l'air. Merci pour votre amour et pour les moments si simples que nous passons et passerons ensemble.

« Ne vous découragez pas, c'est souvent la dernière clef du
trousseau qui ouvre la porte »

Paulo Coelho

Table des matières

Remerciements	1
Table des illustrations.....	13
Liste des abréviations.....	17
Chapitre 1. Introduction	21
I. Les virus : des parasites intracellulaires divers et variés pas si inoffensifs	21
I.1 Généralités et classification	21
I.2 Cycle de réplication	23
I.3 Pathogénèse des infections virales	26
I.4 Traitements	27
I.4.1 Mode d'action des molécules antivirales	28
II. Les antiviraux en médecine vétérinaire.....	29
II.1 La recherche antivirale au cours des siècles.....	29
II.2 La recherche vétérinaire à la traine.....	32
II.3 Importance de la recherche antivirale vétérinaire	36
II.3.1 Optimiser et renforcer le contrôle des épizooties.....	36
II.3.2 Réduire la cytotoxicité des antiviraux actuels, optimiser leur efficacité et surmonter les résistances virales	38
III. Techniques de virologie pour la découverte de molécules antivirales	39
III.1 Méthodes conventionnelles.....	40
III.1.1 Etude des plages de lyses (<i>plaque assay</i>)	40
III.1.2 Quantification par dilution limite.....	41
III.1.3 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)	43
III.1.4 Immunofluorescence	45
III.2 Mesure de l'impédance comme nouvelle méthode d'étude.....	46
III.3 Repositionnement de composés et criblage à haut contenu pour la découverte rapide de molécules antivirales	48
IV. Technologie ANCHOR™ : un nouvel outil pour le suivi du cycle viral en temps réel	50
IV.1 Système ANCHOR™ : origine et description.....	52
IV.2 Technologie ANCHOR™ appliquée à la virologie	55
V. L'herpèsvirus équin de type 1	56
V.1 Un virus au sein d'une grande famille	56

V.2	Structure et organisation génomique de HVE-1	58
V.2.1	Organisation du génome	58
V.2.2	Capside	59
V.2.3	Tégument	59
V.2.4	Enveloppe	60
V.3	Cycle de réplication d'HVE-1	60
V.3.1	Attachement des particules sur la cellule cible.....	62
V.3.2	Entrée des particules dans la cellule	62
V.3.3	Transport jusqu'au pore nucléaire	64
V.3.4	Transcription des gènes et réplication de l'ADN	64
V.3.5	Assemblage et sortie des particules virales.....	65
V.4	Pathogénèse d'HVE-1	66
V.4.1	Système respiratoire et rhinopneumonie	67
V.4.2	Ganglions lymphatiques et virémie	68
V.4.3	Réseau vasculaire : avortement, myéloencéphalopathie et lésions oculaires	68
V.4.3.1	Avortement	69
V.4.3.2	Myéloencéphalopathie	69
V.4.3.3	Lésions oculaires.....	70
V.4.4	Neuropathogénicité et virulence des souches d'HVE-1	70
V.4.5	Latence et réactivation	71
V.5	Impact économique d'HVE-1	73
V.6	Mesures de prévention des épizooties.....	75
V.6.1	Bonnes pratiques générales	77
V.6.2	Mesures sanitaires pour le contrôle des épizooties.....	77
V.6.3	Vaccination	78
V.6.3.1	Vaccins inertes	79
V.6.3.2	Vaccins vivants	79
V.6.3.3	La vaccination est-elle vraiment efficace ?.....	80
V.7	Traitements	80
V.7.1	Analogues nucléosidiques.....	81
V.7.1.1	Acyclovir et valacyclovir.....	82
V.7.1.2	Ganciclovir et valganciclovir.....	83
V.7.1.3	Penciclovir et Famciclovir	84
V.7.1.4	A-5021	84
V.7.2	Analogues nucléotidiques.....	84

V.7.2.1 Adéfovir	85
V.7.2.2 Cidofovir	85
V.7.3 Récents développements	85
V.7.4 Une médecine humaine peu adaptée aux chevaux	87
V.7.5 Antiviraux et résistance	88
Chapitre 2. Objectifs de la thèse	89
Chapitre 3. Matériel et méthodes	91
I. Lignées cellulaires	91
II. Herpèsvirus équin	91
II.1 Souche virale	91
II.2 Production, purification et titration	92
III. Extraction et quantification de l'ADN viral par qPCR	92
IV. Chimiothèque Prestwick Chemical	93
V. Microscopie	94
V.1 Microscopie à fluorescence et traitement d'images	94
V.2 Microscopie à haut contenu	94
VI. Statistiques	94
Chapitre 4. Développement d'un HVE-1 ANCHOR™ pour l'étude et la quantification de l'infection par l'herpèsvirus équin de type 1	95
I. Préambule	95
II. Matériel et Méthodes	96
II.1 Matériel	96
II.1.1 Plasmides	96
II.1.2 Oligonucléotides et programmes PCR	96
II.1.3 Enzymes de restriction	97
II.2 Méthodes	98
II.2.1 Clonage	98
II.2.1.1 Transformation de bactéries	98
II.2.1.2 Purification des plasmides	98
II.2.1.3 Digestions enzymatiques	98
II.2.1.4 Electrophorèses	100
II.2.1.5 Déphosphorylations	100
II.2.1.6 Ligations	100
II.2.1.7 Transfections	100
II.2.2 Recombinaison homologue	100
II.2.3 Purification et production de HVE-1 ANCHORGFP	101

II.2.4	Titration d'HVE-1 ANCHORGFP.....	101
II.2.5	Caractérisation de HVE-1 ANCHOGFP	102
II.2.5.1	Caractérisation génomique	102
II.2.5.2	Propriétés biologiques	102
II.2.5.3	Visualisation du cycle d'HVE-1 en temps réel	103
II.2.5.3.1	Suivi de l'infection et de la réplication d'HVE-1	103
II.2.5.3.2	Marquage de l'actine	103
II.2.5.4	Quantification d'HVE-1 ANCHORGFP	103
II.2.5.4.1	Quantification en temps réel d'HVE-1 ANCHORGFP	103
II.2.5.4.2	Calibration d'HVE-1 ANCHORGFP pour le HCS	104
III.	Résultats.....	105
III.1	Construction du plasmide de transfert pUC19HVE1ANCHORGFP.....	105
III.1.1	Stratégie générale.....	105
III.1.2	Clonage de pUC19HVE1ANCHORGFP.....	106
III.1.2.1	1 ^{ère} étape : insertion de <i>eco.gpt</i> et des sites de restriction.....	106
III.1.2.2	2 ^{ème} étape : insertion du promoteur pCMV	109
III.1.2.3	3 ^{ème} étape : insertion du système ANCHOR™	112
III.1.2.4	4 ^{ème} étape : insertion de la première zone d'homologie (ORF14).....	116
III.1.2.5	5 ^{ème} étape : insertion de la deuxième zone d'homologie (ORF13)....	120
III.2	Recombinaison homologue	125
III.3	Purification de l'HVE-1 ANCHORGFP	127
III.4	Caractérisation de l'HVE-1 ANCHORGFP	130
III.4.1	Vérification du site de recombinaison.....	130
III.4.2	Propriétés biologiques d'HVE-1 ANCHORGFP	132
III.4.3	Cinétique de réplication de l'HVE-1 ANCHORGFP.....	134
III.5	HVE-1 ANCHORGFP pour l'étude de l'infection et de la réplication virale	135
III.6	HVE-1 ANCHORGFP pour l'identification de nouvelles molécules antivirales .	139
III.6.1	Algorithme de quantification	139
III.6.2	Application d'HVE-1 ANCHORGFP pour le HCS.....	142
III.6.3	Quantification d'HVE-1 en temps réel.....	145
IV.	Discussion.....	147
Chapitre 5.	HVE-1 ANCHORGFP et criblage à haut contenu pour l'identification de nouvelles molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin de type 1	151
I.	Préambule	151
II.	Matériel et Méthodes	151

II.1	Protocole de criblage	151
II.1.1	Criblage primaire et secondaire	151
II.1.2	Détermination des fenêtres thérapeutiques	152
II.1.2.1	Calcul de l'IC50.....	152
II.1.2.2	Calcul de la CC50	153
II.1.2.3	Détermination de la fenêtre thérapeutique de composés propriétaires	153
III.	Résultats.....	154
III.1	Identification de nouvelles molécules antivirales.....	154
III.2	Confirmation de l'activité antivirale.....	160
III.3	Détermination des fenêtres thérapeutiques.....	160
III.3.1	Etude de l'activité antivirale.....	161
III.3.2	Mesure de la cytotoxicité	163
III.3.3	Calcul des fenêtres thérapeutiques	164
III.4	Efficacité du LAVR289 et du LB56 contre HVE-1 ANCHORGFP	165
IV.	Discussion.....	169
Chapitre 6.	Quantification automatisée de l'effet cytopathique pour une identification rapide de molécules antivirales.....	173
I.	Préambule	173
II.	Matériel et Méthodes	174
II.1	Quantification automatisée sur RK13	174
II.2	Quantification automatisée sur ED.....	174
II.2.1	Mise au point de l'algorithme	174
II.3	Etude comparative entre la quantification d'HVE-1 ANCHOGFP, la quantification automatisée de l'ECP et la qPCR.....	174
III.	Résultats.....	175
III.1	Développement d'une quantification automatisée des syncytia sur cellules RK13	175
III.1.1	Mise au point de l'algorithme de quantification.....	175
III.1.1.1	Essai de quantification directe sur la lumière transmise	175
III.1.1.2	Algorithme de quantification en 3 étapes	175
III.1.1.3	Quantification automatisée des syncytia	181
III.1.2	Identification de molécules antivirales et comparaison avec le criblage HVE-1 ANCHORGFP	183
III.1.2.1	Criblage primaire	184
III.1.2.2	Comparaison des fenêtres thérapeutiques.....	187
III.1.3	Précision de la quantification automatisée des syncytia	188

III.2 Développement d'une quantification automatisée des cellules rondes sur cellules ED	190
III.2.1 Algorithme de quantification	190
III.2.2 Activité antivirale du ganciclovir, LAVR289 et LB56 sur ED.....	194
III.2.3 Précision de l'algorithme de quantification des cellules rondes.....	196
IV. Discussion.....	198
Chapitre 7. Conclusions générales et perspectives.....	201
Références	207
Annexe 1. Inhibiteurs d'HVE-1 identifiés lors du criblage primaire	233
Annexe 2. Activateurs d'HVE-1 identifiés lors du criblage primaire	236
Annexe 3. Résultats du criblage secondaire	238
Annexe 4. Cytotoxicité des composés.....	239
Annexe 5. Inhibiteurs d'HVE-1 identifiés par quantification automatisée des syncytia	242
Résumé	244
Abstract	244

Table des illustrations

Figures

Figure 1. Composition des virus.	22
Figure 2. Classification de Baltimore.	22
Figure 3. Hiérarchisation des virus selon l'ICTV.	23
Figure 4. Représentation simplifiée du cycle de réplication des virus.	25
Figure 5. Infections virales aiguës et persistantes.	27
Figure 6. Principaux modes d'action des molécules antivirales.	28
Figure 7. Historique des antiviraux commercialisés entre 1959 et 2016.	30
Figure 8. Principales étapes de la découverte d'un médicament à son autorisation de mise sur le marché.	32
Figure 9. Evolution de la virulence du virus de la maladie de Marek.	37
Figure 10. Exemple de quantification par plages de lyse.	41
Figure 11. Exemple de quantification par dilution limite.	42
Figure 12. Étapes de la PCR.	43
Figure 13. Principaux systèmes utilisés en qPCR.	44
Figure 14. Principe de l'immunofluorescence.	45
Figure 15. Principe du RTCA xCELLigence.	46
Figure 16. Evolution du cell index en fonction de l'état prolifératif des cellules.	47
Figure 17. Système ParABS et ségrégation plasmidique.	53
Figure 18. Système ANCHOR™.	54
Figure 19. Principe du système ANCHOR™.	54
Figure 20. Exemples de virus ANCHORGFP.	55
Figure 21. Classification simplifiée des herpesvirus, de l'ordre Herpesvirales à HVE-1.	57
Figure 22. Structure d'une particule d'HVE-1.	58
Figure 23. Organisation génomique d'HVE-1.	59
Figure 24. Cycle de HVE-1.	61
Figure 25. Attachement et entrée des particules d'HVE-1.	63
Figure 26. Sortie des nouvelles particules virales selon le modèle d'enveloppement / dé-enveloppement et re-enveloppement.	65
Figure 27. Cycle pathologique d'HVE-1.	67
Figure 28. Latence et réactivation.	72
Figure 29. Mesures de prévention et de contrôle des épizooties d'HVE-1.	76
Figure 30. Mécanisme d'action des analogues nucléosidiques et nucléotidiques.	81
Figure 31. Schéma d'une plaque de la Prestwick.	93
Figure 32. Insertion de E.GPT et des sites de restriction dans pUC19.	107
Figure 33. Vérification de l'insertion de la séquence eco.gpt dans le plasmide pUC19 par digestion KasI / ScaI-HF et XbaI.	108
Figure 34. Vérification des clones pUC19 ou pUC19 E.GPT par digestion BamHI ou BamHI / HindIII.	109
Figure 35. Représentation schématique de l'insertion du promoteur pCMV dans pUC19 E.GPT.	110
Figure 36. Digestion des clones obtenus par BglII et MluI après clonage du promoteur pCMV dans pUC19 E.GPT.	111
Figure 37. Clonage de la cassette auto-fluorescente ANCHOR™ dans pUC19 pCMV E.GPT.	112

Figure 38. Résultats de la digestion BglII des clones obtenus après ligation du système ANCHOR™ dans le plasmide pUC19 pCMV E.GPT.....	113
Figure 39. Résultat de la PCR ANCHORGFP sur les 3 clones supposés positifs.....	114
Figure 40. Expression du système ANCHOR™.....	114
Figure 41. Carte du plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP.....	115
Figure 42. Insertion de la première zone d'homologie ORF14 entre les sites AsiSI et PacI du plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP.....	117
Figure 43. Vérification du clonage du gène ORF14 dans pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP par digestion NotI.....	118
Figure 44. Vérification de la présence du gène ORF14 dans les clones C1, C2 et C5 obtenus après ligation dans pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP.....	119
Figure 45. Vérification de l'orientation du gène ORF14 dans les clones pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 obtenus par digestion avec AflII.....	120
Figure 46. Représentation schématique du clonage de la 2 ^{ème} zone d'homologie ORF13 dans le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14.....	121
Figure 47. Digestion Scal des clones obtenus après ligation du système de ORF13 dans pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14.....	122
Figure 48. PCR ORF13 des clones pUC19 HVE-1 ANCHORGFP.....	122
Figure 49. Carte du plasmide de transfert pUC19 HVE1ANCHORGFP.....	123
Figure 50. Vérification de l'expression du système ANCHOR™ par pUC19HVE1ANCHORGFP.....	124
Figure 51. Représentation schématique de la recombinaison homologue.....	125
Figure 52. Plage fluorescente obtenue après recombinaison homologue entre le plasmide pUC19HVE1ANCHORGFP et HVE-1 WT.....	126
Figure 53. Premier passage de purification, 24h post infection.....	127
Figure 54. Plages d'HVE-1 ANCHORGFP 48h post-infection.....	128
Figure 55. HVE-1 ANCHORGFP obtenu après 4 étapes de purification.....	129
Figure 56. Gel d'électrophorèse des PCRs ORF13 et ORF14.....	130
Figure 57. Gel d'électrophorèse de la PCR ORF13/ORF14.....	131
Figure 58. Gel d'électrophorèse de la PCR ANCHORGFP.....	132
Figure 59. Comparaison de l'effet cytopathique d'HVE-1 WT et HVE-1 ANCHORGFP.....	133
Figure 60. Comparaison du titre viral d'HVE-1 WT et HVE-1 ANCHORGFP.....	134
Figure 61. Cinétique de réplication virale d'HVE-1 WT et HVE-1 ANCHORGFP.....	135
Figure 62. Suivi de l'infection et de la réplication d'HVE-1 ANCHORGFP dans des RK13.....	136
Figure 63. Structure de l'actine filamentaire dans des cellules RK13 infectées par HVE-1 ANCHORGFP.....	137
Figure 64. Infection et réplication d'HVE-1 ANCHORGFP dans les cellules ED.....	138
Figure 65. Détection et segmentation des objets.....	140
Figure 66. Algorithme de quantification d'HVE-1 ANCHORGFP.....	141
Figure 67. Activité antivirale et cytotoxicité des 80 composés testés contre HVE-1 ANCHORGFP.....	143
Figure 68. Visualisation de l'activité antivirale du ganciclovir, de l'auranofine et de l'azacytidine-5 contre HVE-1 ANCHORGFP.....	144
Figure 69. Cinétique de quantification d'HVE-1 ANCHORGFP en temps réel.....	146
Figure 70. Activité des 1280 composés de la banque Prestwick Chemical contre HVE-1.....	154
Figure 71. Z' factor.....	155
Figure 72. Activité des inhibiteurs et des activateurs d'HVE-1 identifiés.....	156
Figure 73. Cytotoxicité des composés identifiés.....	157
Figure 74. Domaine d'application et classe thérapeutiques des inhibiteurs et activateurs d'HVE-1 identifiés lors du criblage primaire.....	158
Figure 75. Activité antivirale des composés sélectionnés.....	159
Figure 76. Activité antivirale des 18 composés du criblage secondaire.....	160
Figure 77. Exemples d'IC50.....	161

Figure 78. IC50 du ganciclovir, LAVR289 et LB56.....	166
Figure 79. Cytotoxicité du ganciclovir, LAVR289 et LB56.	167
Figure 80. 1 ^{ère} étape : identification et délimitation des syncytia et des cellules uniques.....	176
Figure 81. 2 ^{ème} étape : sélection sur la lumière transmise	177
Figure 82. 3 ^{ème} étape : sélection et quantification des syncytia.....	178
Figure 83. Paramètres obtenus par la quantification automatisée à 3 étapes.	179
Figure 84. Mesure de l'activité antivirale de 80 composés de la Prestwick.	180
Figure 85. Algorithme de quantification automatisée des syncytia.	182
Figure 86. Quantification automatique des syncytia.....	183
Figure 87. Résultats du criblage primaire par quantification automatisée des syncytia.	184
Figure 88. Activité antivirale des composés sélectionnés suite à la quantification automatisée des syncytia.....	185
Figure 89. Z' factor obtenus pour la quantification automatique des syncytia.	186
Figure 90. Comparaison des IC50 du ganciclovir obtenues par quantification qPCR, HVE-1 ANCHORGFP et effet cytopathique.....	189
Figure 91. Algorithme de quantification des cellules rondes.....	191
Figure 92. Quantification automatisée des cellules rondes.....	192
Figure 93. Quantification en temps réel du nombre de cellule rondes.	193
Figure 94. IC50 obtenues par la quantification des cellules rondes.	194
Figure 95. Détermination des CC50 et mesure de la cytotoxicité du ganciclovir, LAVR289 et LB56 sur ED.....	195
Figure 96. Comparaison des IC50 obtenues par qPCR et par quantification des cellules rondes.	197

Tableaux

Tableau 1. Epidémies et pandémies virales de 1918 à nos jours.	31
Tableau 2. Liste des composés testés contre le FIV et leur application chez l'Homme.	34
Tableau 3. Principaux antiviraux utilisés en médecine vétérinaire.	35
Tableau 4. Principales caractéristiques des principales techniques virologiques et leur application pour le criblage à haut contenu.	50
Tableau 5. Impact économique d'un foyer d'HVE-1.	74
Tableau 6. Impact économique de l'épizootie d'HVE-1 en France entre mars et juin 2018. ...	75
Tableau 7. Vaccins disponibles ou ayant été utilisés pour lutter contre HVE-1.	78
Tableau 8. Activité des molécules antivirales humaines contre HVE-1.	86
Tableau 9. Coût total de l'utilisation du valacyclovir, valganciclovir et ganciclovir pour traiter une infection par HVE-1 chez un cheval de 500kg.	87
Tableau 10. Amorces et programme utilisés pour la quantification de l'ADN d'HVE-1 par qPCR.	92
Tableau 11. Amorces et programmes PCRs utilisés pour le clonage du plasmide de transfert.	97
Tableau 12. Enzymes de restriction et protocoles de digestions utilisés lors des différentes étapes de construction du plasmide de transfert.	99
Tableau 13. Amorces et programme PCR utilisés pour l'amplification de ORF13/ORF14 et leur région intergénique.	102
Tableau 14. Pureté d'HVE-1 ANCHORGFP.	129
Tableau 15. Détermination du Z' factor.	145
Tableau 16. IC50 des 10 composés anti-HVE-1.	162
Tableau 17. CC50 des 10 composés anti-HVE-1 sur cellules RK13.	163
Tableau 18. Fenêtres thérapeutiques des 10 composés anti-HVE-1.	164
Tableau 19. Fenêtre thérapeutique du ganciclovir, LAVR289 et LB56.	168
Tableau 20. IC50 obtenues par la quantification automatisée de l'effet cytopathique.	187
Tableau 21. Fenêtres thérapeutiques obtenues par quantification automatisée des syncytia.	188
Tableau 22. Fenêtres thérapeutiques du ganciclovir, LAVR289 et LB56 sur ED.	196

Liste des abréviations

ACV	acyclovir
ADN	acide désoxyribonucléique
ANSES	agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	acide ribonucléique
BAC	chromosome artificiel bactérien
BAC-FP	chromosome artificiel bactérien couplée à une protéine fluorescente
BoHV-1	herpèsvirus bovin de type 1
BSA	albumine de sérum bovin
CC50	concentration cytotoxique 50
CDV	cidofovir
CHM-1	complexe majeure d'histocompatibilité de type 1
CHO	cellules d'ovaires de hamster
CIFRE	convention individuelle de formation par la recherche en entreprise
Cneg	contrôle négatif
COVID	maladie à coronavirus
Cpos	contrôle positif
CPV	parvovirus canin
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde
E.coli	<i>Escherichia.coli</i>
EC	écart-type
Eco.gpt	gène de la xanthine-guanine phosphoribosyltransferase d' <i>Escherichia.coli</i>
ECP	effet cytopathique
ED	cellules dermiques équine
EHM	myéloencéphalopathie équine
EMA	agence européenne du médicament
EPBMCs	cellules équine mononuclées du sang périphérique
FDA	<i>food and drug administration</i>
FHV-1	herpès félin de type 1
FIPV	parvovirus félin
FIV	virus de l'immunodéficience féline
FP	protéine fluorescente
GaHV-2	gallid herpèsvirus de type 2
GCV	ganciclovir
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
hADV5	adénovirus humain de type 5
HBV	virus de l'hépatite B
HCF-1	<i>human factor C1</i>
hCMV	cytomégalovirus humain
HCS	<i>high content screening</i> (criblage à haut contenu)
HCV	virus de l'hépatite C

HPV	virus papilloma humain
HSV	virus herpès simplex
HVE-1	herpèsvirus équin de type 1
HVE-1 WT	herpès équin parental (non marqué)
HVeA	<i>herpesvirus entry mediator A</i>
HVT	herpèsvirus de dinde
IC50	concentration inhibitrice 50
ICTV	comité international de taxonomie des virus
IDU	idoxuridine
IE	<i>immediate early</i>
IF	immunofluorescence
IFCE	institut français du cheval et de l'équitation
IFN	Interféron
INM	membrane nucléaire interne
IRL	séquence interne répétée longue
IRS	séquence interne répétée courte
LAT	<i>latency associate transcript</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
MCP	protéine majeure de capsid
MCS	site multiple de clonage
MDV	virus de la maladie de Marek
MERS	syndrome respiratoire du Moyen-Orient
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPX	virus monkeypox
mRNA	ARN messenger
MT	marqueur de taille
N.D	non déterminé
n.s	non significatif
ND	non digéré
NEB	New England Biolabs
ONM	membrane nucléaire externe
ORF	cadre ouvert de lecture
PBMCs	cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	tampon phosphate salin
PC	plasmide contrôle
pCMV	promoteur du cytomégalovirus humain
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PCV	penciclovir
PFU (ou UFP)	<i>plaque forming unit</i>
qPCR	réaction de polymérisation en chaîne quantitative
R&D	recherche et développement
RESPE	réseau d'épidémio-surveillance des pathologies équines
RK13	cellules rénales de lapin
RSV	virus syndrome respiratoire
RTCA	<i>real time cellular analysis</i> (analyse cellulaire en temps réel)
RT-PCR	<i>reverse-transcriptase PCR</i>

RT-qPCR	<i>reverse-transcriptase qPCR</i>
SARS-CoV2	coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
SI	<i>selectivity index</i> (fenêtre thérapeutique)
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SNC	système nerveux central
SuHV-1	herpèsvirus porcin de type 1
TCID50	<i>tissue culture dose 50</i>
TeVHV3	testudinid herpèsvirus 3
TGN	réseau trans-golgien
TRL	séquence terminale répétée longue
TRS	séquence terminale répétée courte
UL	séquence longue unique
US	séquence courte unique
VAGCV	valganciclovir
VARV	virus de la variole
VIH ou HIV	virus de l'immunodéficience humaine
VZV	varicella zoster virus (virus de la varicelle)

Chapitre 1.

Introduction

I. Les virus : des parasites intracellulaires divers et variés pas si inoffensifs

I.1 Généralités et classification

Depuis toujours, les virus évoluent avec les organismes qu'ils infectent et peuvent interagir avec les trois domaines du vivant que sont les archées, les bactéries et les eucaryotes, parmi lesquels se trouve l'Homme. Cependant, l'évolution conjointe de l'Homme et des virus au cours du temps a rendu difficile l'identification de ces derniers en tant qu'organismes propres. Même si de grands succès, tels que la vaccination contre la variole initiée par Jenner en 1798, ou celle contre la rage de Pasteur en 1885 ont été établis auparavant [1], il faut attendre les travaux de Beijerinck sur la mosaïque du tabac en 1899 pour que le concept de virus émerge réellement [2].

D'une taille allant de 20nm pour les plus petits à 1 500nm pour les plus grands [3], les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires devant utiliser la machinerie cellulaire de leur hôte pour se multiplier, et qui sont généralement constitués de 2 principaux éléments [4] (Figure 1) :

- un acide nucléique pouvant correspondre à de l'ADN double brin, simple brin, ou de l'ARN segmenté ou non segmenté, simple brin de polarité positive ou négative, ou double brin
- une structure protectrice appelée capsid et constituée de une ou plusieurs protéines.

En plus de ces éléments, certains virus possèdent une structure lipido-protéique externe, l'enveloppe, et sont donc appelés virus enveloppés.

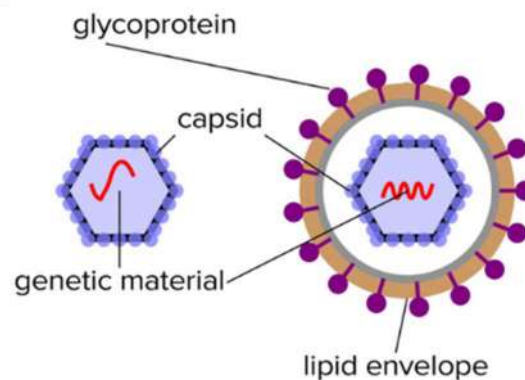


Figure 1. Composition des virus.

Gauche : virus nu (non enveloppé) constitué d'un acide nucléique protégé par une capsid. Droite : virus enveloppé comprenant en plus une enveloppe lipidique dans laquelle sont incorporées des glycoprotéines. Modifié à partir de Reddy et Sansom, 2016 [5].

Par leur grande diversité, les virus sont définis selon une classification bien précise mise en place en 1971 par David Baltimore. Ainsi, les virus sont divisés en 7 grands groupes selon la structure et les caractéristiques de leur acide nucléique [6] (Figure 2).

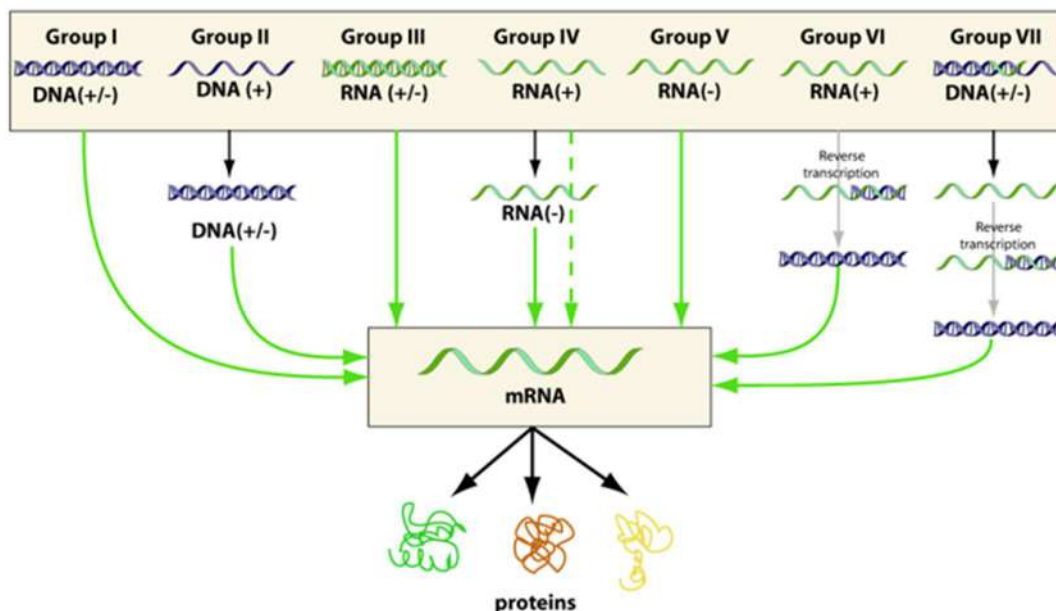


Figure 2. Classification de Baltimore.

Groupe 1 : virus à ADN double brin. Groupe 2 : virus à ADN simple brin. Groupe 3 : virus à ARN double brin. Groupe 4 : virus à ARN simple brin de polarité positive. Groupe 5 : virus à ARN simple brin de polarité négative. Groupe 6 : virus à ARN simple brin reverse transcrit. Groupe 7 : virus à ADN reverse transcrit.

Schéma : <https://viralzone.expasy.org/254>

Cette classification sert de base pour le comité international de taxonomie des virus (ICTV) dont le but est de classer et de hiérarchiser les différents virus en plusieurs niveaux, selon leurs propriétés génomiques et biologiques communes (Figure 3).



Figure 3. Hiérarchisation des virus selon l'ICTV.

Un virus fait donc partie d'un ordre, regroupant plusieurs familles, elles-mêmes divisées en sous-familles. Ces sous-familles peuvent également être séparées en différents genres regroupant les virus par espèces.

1.2 Cycle de réplication

Contrairement aux eucaryotes et aux procaryotes, les virus ne peuvent pas se multiplier par division ou fission cellulaire, et les nouvelles particules virales, aussi appelées virions, sont formées suite à l'assemblage des différents composants. Cependant, comme les virus ne possèdent pas de métabolisme propre, la synthèse d'une partie ou de la totalité de leurs composants doit obligatoirement être réalisée par la machinerie cellulaire de l'hôte. Ainsi, le cycle de réplication se divise en plusieurs étapes communes à l'ensemble des virus, qu'ils soient à ADN ou à ARN [7] [8] (Figure 4).

Tout d'abord, les particules virales doivent s'accrocher à la cellule cible, lors d'une étape appelée adsorption ou attachement, représentée par la liaison de haute affinité entre une protéine virale et un récepteur cellulaire. Les récepteurs cellulaires utilisés pour l'adsorption peuvent être de nature variée, telle que des protéines, des lipides ou encore des carbohydrates, mais constituent tous des molécules qui sont exprimées par la cellule hôte, non pas pour faciliter l'entrée du virus, mais parce qu'elles possèdent un rôle physiologique pour la cellule elle-même.

Après attachement, les particules virales vont pouvoir pénétrer à l'intérieur de celle-ci. Tout comme pour l'attachement, cette étape d'entrée est le résultat d'une interaction entre protéines virales et récepteurs cellulaires. Suite à cette liaison, une cascade de signalisation cellulaire est mise en place et permet l'entrée des particules virales selon trois mécanismes :

- l'endocytose qui correspond à l'enveloppement et l'absorption d'une particule virale par la membrane plasmique cellulaire. L'endocytose est le mécanisme le plus utilisé pour la pénétration des particules virales et peut avoir différentes formes selon le récepteur utilisé. Ainsi, certaines particules vont entrer par endocytose clathrine ou cavéoline dépendante, tandis que d'autres seront enveloppées par des prolongements de la membrane plasmique lors d'un phénomène appelé macropinocytose [9].
- la fusion, qui est l'un des mécanismes utilisés par les virus enveloppés, et qui, comme son nom l'indique, représente la fusion entre l'enveloppe des particules virales et la membrane plasmique cellulaire ou la membrane d'un endosome.
- la translocation directe de la capsidite à l'intérieur de la cellule hôte, qui peut être utilisée pour les virus non enveloppés, mais qui est assez rare.

Une fois à l'intérieur de la cellule cible, les particules virales doivent se débarrasser de leur capsidite afin que le génome viral puisse être répliqué. Cette étape, appelée décapsidation, peut être totale ou partielle, et peut avoir lieu dans le cytoplasme ou dans les endosomes.

Lorsque les particules virales ont perdu leur capsidite et que le génome viral a atteint son site de répllication, qui peut-être le noyau ou le cytoplasme selon le virus considéré, la transcription des gènes et la répllication du génome viral sont réalisées par des enzymes cellulaires et/ ou virales et sont spécifiques à chaque groupe de virus.

Après répllication du génome et traduction des protéines virales, le génome viral et les différents composants synthétisés doivent être assemblés ensemble afin de former les nouvelles particules virales. Selon le virus considéré, l'assemblage peut avoir lieu dans le noyau, la membrane plasmique ou l'appareil de Golgi, et entraîne le plus souvent la formation de particules virales non matures.

Ainsi, des modifications structurales de la capside et / ou de l'enveloppe virale vont être apportées post-assemblage afin de transformer les particules virales non matures en virions infectieux.

Enfin, la dernière étape du cycle viral correspond à la dispersion des nouvelles particules virales pour permettre la propagation de l'infection selon différents mécanismes [10] :

- lyse cellulaire, qui correspond à la propagation des particules virales dans le milieu extracellulaire suite à la destruction de la cellule hôte. On parle alors de cycle de réplication lytique.
- exocytose ou bourgeonnement de la membrane plasmique, par lequel les virus enveloppés acquièrent une partie de leur enveloppe, et qui permet également de disperser les particules virales dans le milieu extracellulaire afin qu'elles puissent infecter de nouvelles cellules.
- transmission inter-cellulaire, correspondant à la diffusion des particules virales d'une cellule infectée à une cellule non infectée sans passer par le milieu extracellulaire, et qui peut être mise en place soit par la formation de projections entre les cellules, soit par la fusion des cellules entre elles pour former des structures virales particulières appelées syncytia.

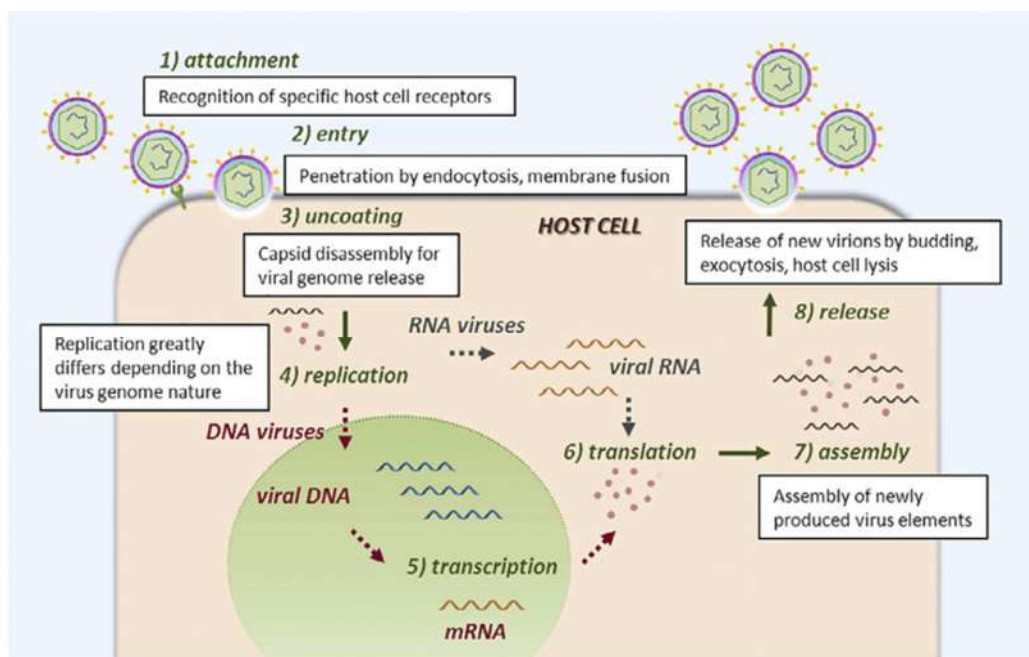


Figure 4. Représentation simplifiée du cycle de réplication des virus.

1) Attachement des particules virales par liaison entre une protéine virale et un récepteur cellulaire. 2) Entrée des particules virales par fusion ou endocytose après interaction entre des protéines virales et des

récepteurs cellulaires spécifiques. 3) Décapsidation. 4-5) Pour les virus à ADN, excepté les poxvirus, la transcription des gènes et la réplication du génome viral ont lieu dans le noyau, alors que pour une majorité des virus à ARN et les poxvirus, ces étapes sont réalisées dans le cytoplasme. 6) Traduction des protéines virales dans le cytoplasme de la cellule hôte. 7) Assemblage des nouvelles particules virales et maturation. 8) Dispersion des particules virales infectieuses par lyse cellulaire ou endocytose. Ce schéma donne une vue d'ensemble des principales étapes d'un cycle viral, et certaines étapes spécifiques à des familles virales précises, telles que les *Retroviridae*, ne sont pas représentées. mRNA : ARN messenger. [11]

I.3 Pathogénèse des infections virales

Lorsqu'un virus pénètre à l'intérieur d'un organisme, l'équilibre de ce dernier est perturbé et la réponse immunitaire est activée. Cette phase, pendant laquelle le système immunitaire et les virus sont en compétition, est appelée phase d'infection aiguë et est souvent associée à l'apparition des premiers symptômes typiques d'une infection, tels que la fièvre. L'évolution vers le développement d'une maladie ou la guérison est donc le résultat d'un combat acharné entre virus et système immunitaire [12] [13].

Si le premier l'emporte, le virus va poursuivre sa multiplication et se propager dans l'organisme de l'hôte, induisant ainsi l'apparition de maladies, et pouvant même entraîner la mort de l'hôte pour des pathogènes très virulents.

Heureusement, dans la plupart des cas, le système immunitaire l'emporte rapidement. Le virus est ainsi éliminé lors d'un processus appelé clearance virale. Les symptômes disparaissent et l'équilibre de l'hôte est rétabli (Figure 5A).

Cependant, lorsque la clearance virale n'est pas totale, ou que le virus échappe au système immunitaire, l'infection peut persister dans le temps. Au cours d'une infection persistante, le virus et le système immunitaire s'expriment tous les deux mais sont dans un état d'équilibre. Selon que le virus continue de se répliquer continuellement ou périodiquement, différents types d'infections persistantes peuvent être observés [13] :

- infection chronique productive, pendant laquelle le virus continue de se multiplier, mais pour laquelle l'action du système immunitaire permet d'éviter le développement de nouvelles pathologies sans être assez efficace pour éliminer totalement l'agent infectieux (Figure 5B).
- infection chronique latente, au cours de laquelle l'agent infectieux persiste dans l'organisme de l'hôte sous une forme non répliquative pour laquelle certains facteurs, tels que le stress, peuvent induire des épisodes de réactivation virale induisant l'apparition d'une nouvelle phase aiguë d'infection et de rémission (Figure 5C)

- infection chronique lente ou progressive, pendant laquelle la réplication virale et la production de particules virales sont continues et surexprimées dans certains organes pendant plusieurs années, et pour laquelle l'apparition des symptômes est souvent fatale pour l'hôte (Figure 5D).

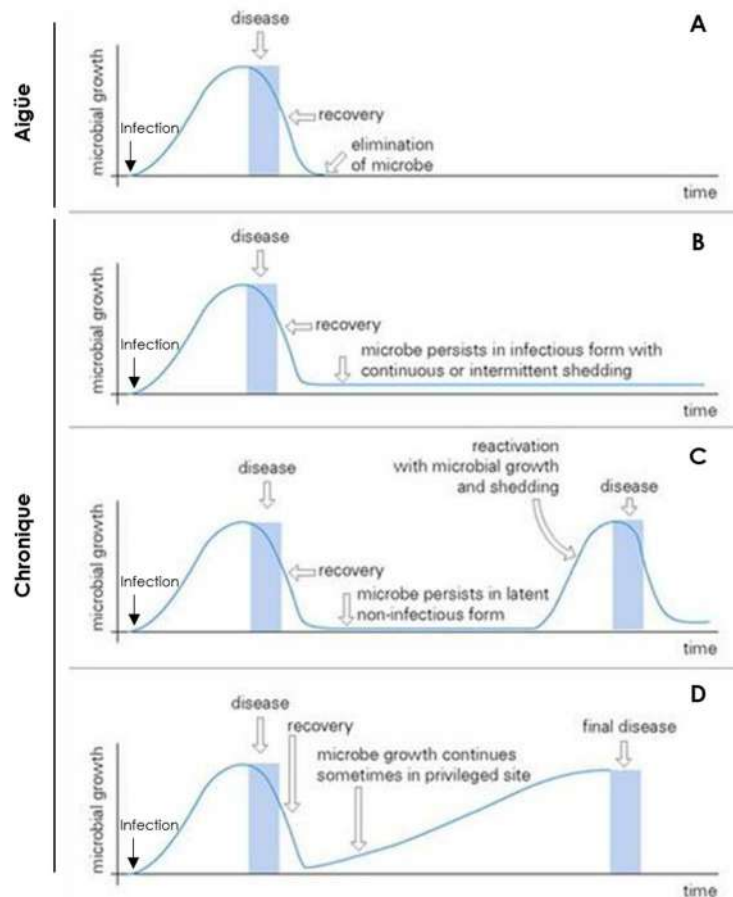


Figure 5. Infections virales aiguës et persistantes.

A. Infection aiguë. B. Infection chronique productive. C. Infection latente. D. Infection chronique à progression lente.

Schéma modifié depuis : <https://schoolbag.info/biology/microbiology/17.html>

1.4 Traitements

Afin de lutter contre les infections virales et d'empêcher le développement d'infections chroniques, l'idéal serait d'utiliser des molécules virucides capables de détruire les particules virales. Cependant, par le lien étroit liant le virus à son hôte, il est impossible de recourir à de tels traitements sans affecter les cellules associées. Afin de préserver les fonctions biologiques de l'hôte, il est ainsi nécessaire d'utiliser des traitements, dits virostatiques, limitant la multiplication ou la production virale sans pour autant éliminer le virus [14].

I.4.1 Mode d'action des molécules antivirales

Pour préserver l'intégrité de l'hôte, les molécules antivirales doivent donc agir sur des processus viraux spécifiques. De ce fait, chaque étape du cycle viral constitue une cible thérapeutique potentielle (Figure 6).

Ainsi, des molécules bloquant la liaison entre les protéines virales et leur récepteur, ou les processus induisant la fusion ou l'endocytose, pourront empêcher l'adsorption et l'entrée des particules virales, évitant ainsi que les cellules soient infectées [15] [16].

Des antiviraux bloquant le processus de décapsidation pourront également empêcher la réplication du génome viral, tout comme des inhibiteurs spécifiques à cette étape, tels que des inhibiteurs de polymérases ou d'intégrases [15].

Parallèlement à la réplication du génome viral, l'inhibition de la synthèse des protéines peut également être un mode d'action très intéressant en empêchant la production de certains composants nécessaires à l'assemblage, la maturation ou l'export des particules virales [17].

Enfin, des molécules ayant un impact sur l'assemblage lui-même, la maturation des nouvelles particules ou bloquant les mécanismes de lyse cellulaire ou d'exocytose empêcheront la production et la libération de nouveaux virions et limiteront ainsi l'infection à une seule cellule [17] [18].

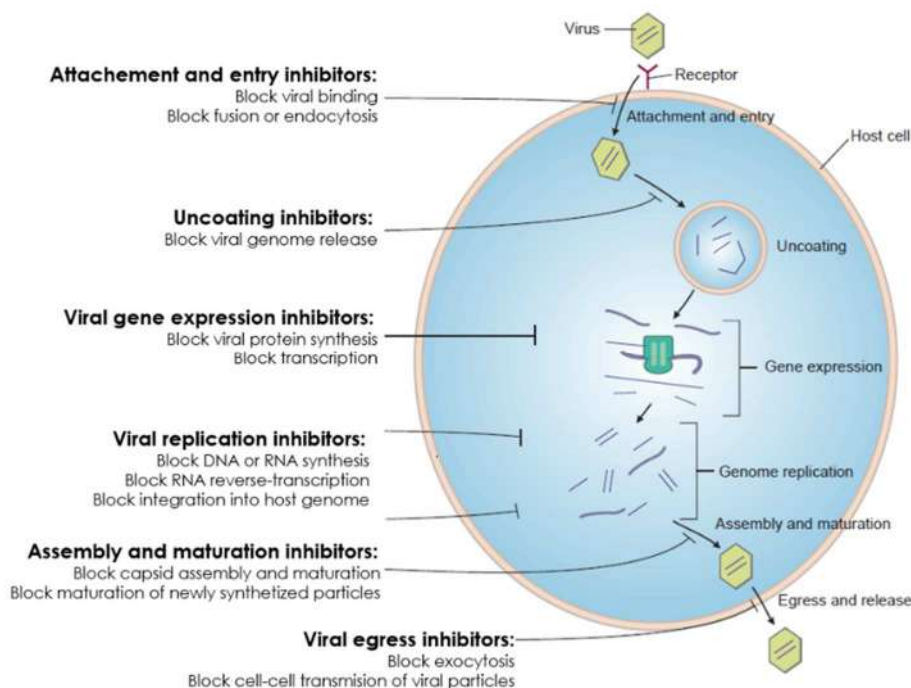


Figure 6. Principaux modes d'action des molécules antivirales.

Modifié depuis Coen et Richman. 2013 [18]

II. Les antiviraux en médecine vétérinaire

II.1 La recherche antivirale au cours des siècles

Malgré l'importance que revêt la découverte de molécules antivirales, l'absence de techniques d'étude et l'impossibilité d'observer ces parasites intracellulaires avec les outils du début du XXème siècle rendent les études virologiques compliquées, et il a fallu patienter presque 60 ans, et les travaux de Weller, Robbins et Ender sur la propagation du virus de la poliomyélite en culture cellulaire pour obtenir une méthode d'étude des virus *in vitro* [19]. Cette découverte fut révolutionnaire pour le monde de la virologie, et les premières études d'activités antivirales sont rapportées en 1950 et 1957, dans les travaux respectifs de Hamre sur les thiosemicarbazones [20] et de Isaacs et Linderman sur les interférons [21], insufflant ainsi l'hypothèse d'une thérapie antivirale spécifique. Cependant, il a fallu attendre 1959, et la synthèse de l'idoxuridine (IDU) par Prusoff [22] pour que la recherche antivirale se développe. D'abord utilisée comme anticancéreux, l'idoxuridine fut la première molécule antivirale approuvée pour une utilisation chez l'Homme en 1963, après que Herman eut découvert ses propriétés antivirales contre le virus de l'herpès simplex (HSV) et celui de la vaccine en 1961 [23]. La recherche antivirale est lancée, mais ne progresse pas rapidement, puisqu'il a fallu près de 10 ans pour que la première molécule antivirale à large spectre, la ribavirine, soit identifiée par Sidwell en 1972 [24]. Cinq ans sont encore nécessaires pour mettre en lumière les propriétés antivirales du 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) guanine, plus connu sous le nom d'acyclovir, contre HSV-1 [25, 26]. Au début des années 1980, la recherche antivirale connaît un essor bondissant suite à l'identification du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'agent infectieux responsable du SIDA. Pour faire face à cette maladie, les laboratoires de virologie et les grands groupes pharmaceutiques se lancent dans une course au traitement. Alors que seuls 8 antiviraux ont été commercialisés en 20 ans, la recherche d'un traitement anti-VIH a permis de révéler l'activité antivirale de nombreux composés. Parmi l'ensemble de ces composés, 25 ont reçu une autorisation d'utilisation chez l'Homme en l'espace de 25 ans, soit la commercialisation d'une molécule par an en moyenne, témoignant de l'avancée de la recherche antivirale [27].

Avec l'apparition de nouvelles maladies virales telles que l'hépatite C, la menace d'émergences virales, et l'apparition de souches résistantes, les recherches pour identifier de nouveaux traitements se sont poursuivies au fil des ans. En 2016, 90 molécules antivirales peuvent être utilisées chez l'Homme, dont 41 pour lutter contre le VIH [28] (Figure 7).

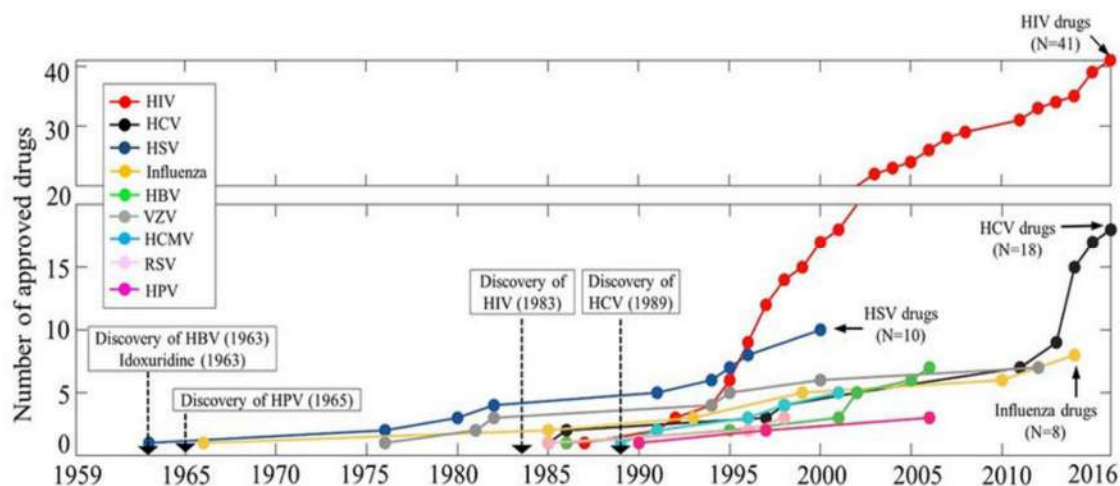


Figure 7. Historique des antiviraux commercialisés entre 1959 et 2016.

Frise chronologique retraçant les dates de commercialisation des antiviraux utilisables chez l'Homme entre janvier 1959 et avril 2016. L'année de découverte de l'hépatite B (HBV), de l'hépatite C (HCV), du papillomavirus (HPV) et du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) est également annotée ; les autres virus ayant été découverts avant 1959. HSV : virus herpès simplex. VZV : virus de la varicelle. HCMV : cytomégalovirus humain. RSV : virus respiratoire syncytial [28].

De nos jours, la recherche antivirale connaît un véritable essor avec la pandémie due au SARS-CoV2 qui touche le monde entier. Avec l'émergence d'une épidémie, ou pandémie, tous les cinq ans environ, il est important, voire impératif, que la recherche antivirale se poursuive et prenne une place plus importante dans le monde de la recherche, afin de pouvoir répondre plus rapidement aux menaces virologiques (Tableau 1).

Année	Événement	Nature, Origine	Morbidité	Impact économique et social
1918-1919	Pandémie de grippe espagnole	Grippe A H1N1, Kansas, Oiseau sauvage	20 à 100 millions de morts	Perte de 3 % du PIB en Australie, 15% au Canada, 17% au Royaume-Uni, 11% aux Etats-Unis
1957-1958	Pandémie de grippe asiatique	Grippe A H2N2 Chine, Canard	0,7 à 1,5 million de morts	Perte de 3% du PIB en Australie, au Canada, au Royaume-Uni et aux Etats-Unis
1968-1969	Pandémie grippale de Hong-Kong	Grippe A H3N2 Hong-Kong, porc / poulet	1 million de morts	23 à 26 milliards de dollars de pertes pour les Etats-Unis
1981-nos jours	Pandémie du VIH	HIV-1 Afrique, primates non humains	Plus de 70 millions de malades 36,7 millions de morts	Perte annuelle de 2 à 4% du PIB en Afrique
2002-2003	Pandémie de SRAS	Coronavirus SARS Chauve-souris, civette	8 098 cas, 774 morts	Perte de PIB de 4 milliards de dollars US dans la région de Hong-Kong et en Chine, 3 à 6 milliards au Canada, 5 milliards à Singapour
2009-2010	Pandémie de grippe porcine mexicaine	Grippe H1N1, Mexique, porc	151 700 à 575 500 morts	Perte de PIB de 1 milliard de dollars EU en République de Corée
2012	Epidémie de MERS	Coronavirus MERS, Moyen-Orient, chauve-souris puis dromadaire	1 879 cas, 659 morts	Perte de 2 milliards de dollars US en République de Corée
2013	Epidémie d'Ebola	Guinée, origine encore indéterminée	28 646 cas, 11 323 morts	Perte de 2 milliards de perte en Guinée, Libéria et Sierra Leone
2015-2016	Pandémie à virus Zika	Virus Zika, Transmission par moustiques	2656 cas de microcéphalie /malformation du système nerveux central	Perte de 7 à 18 milliards de dollars US en Amérique Latine et Caraïbes
2019-2020	Pandémie Covid-19	Coronavirus SARS-CoV2, Chine, Origine encore indéterminée	124 894 108 cas, 2 745 702 morts au 25 mars 2021	Prévision d'une perte de 3 à 6 % du PIB au niveau mondial

Tableau 1. Epidémies et pandémies virales de 1918 à nos jours.

Adapté de Drouet et al, 2021 [29].

II.2 La recherche vétérinaire à la traine

Alors que la recherche antivirale humaine se développe de plus en plus, et de plus en plus rapidement pour faire face aux épidémies que l'Homme doit affronter, la recherche de molécules antivirales pour le marché vétérinaire n'est quasiment pas développée. Pour preuve, en 60 ans, 1 seule molécule antivirale a été autorisée pour une application vétérinaire : l'interféron oméga, pour lutter contre le virus de l'immunodéficience féline (FIV) [30].

Dans le début des années 1990s, une étude de Rollinson évoque plusieurs raisons au manque de développement d'antiviraux vétérinaires [31, 32].

Une des premières raisons, si ce n'est la première, est le manque d'intérêt des grands groupes pharmaceutiques de l'époque pour la recherche vétérinaire. En effet, développer un médicament jusqu'à sa commercialisation nécessite de nombreuses années de travail et demande un investissement économique très important, pour un faible taux de réussite (Figure 8) [33]. L'industrie pharmaceutique a ainsi préféré investir ses ressources dans la médecine humaine, plus importante et à meilleur profit.

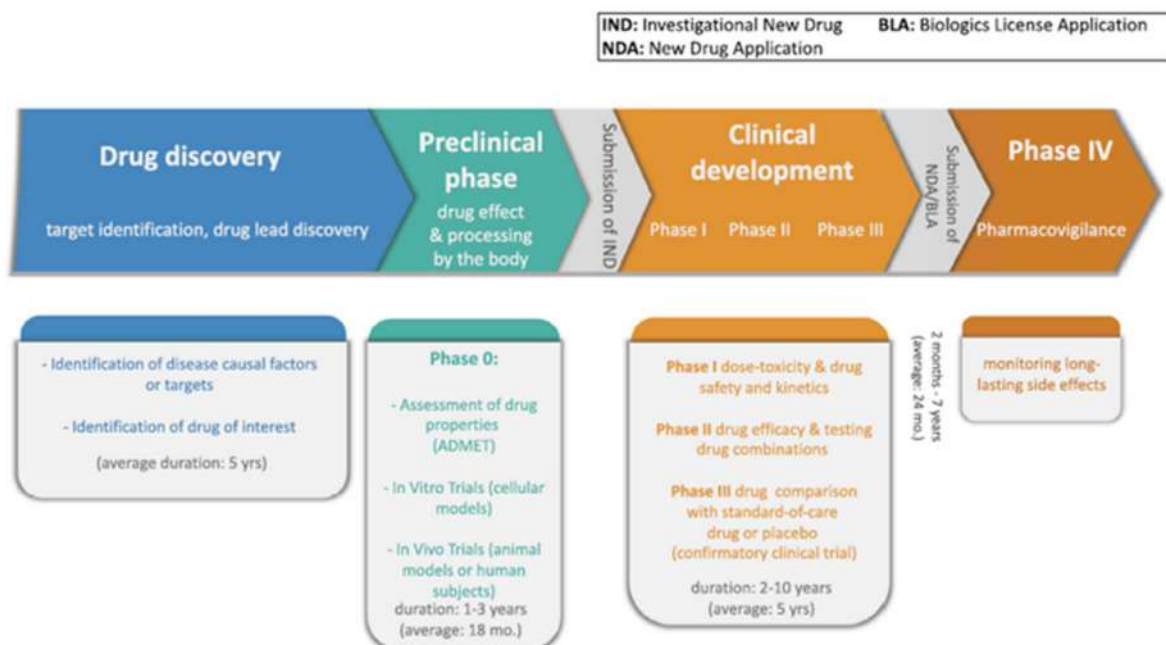


Figure 8. Principales étapes de la découverte d'un médicament à son autorisation de mise sur le marché.

Réda et al, 2020 [33].

Une autre raison est la difficulté de trouver un antiviral à large spectre, c'est à dire capable d'inhiber plusieurs virus, et cela sans barrière d'espèce. En effet, par la forte spécificité hôte-virus, certaines molécules antivirales prometteuses chez une espèce se sont montrées inefficaces pour traiter le même virus chez une autre espèce, comme par exemple l'acyclovir [34]. De plus, les rares molécules démontrant une activité antivirale contre différentes familles de virus se sont souvent révélées cytotoxiques chez l'une ou plusieurs des espèces cibles. Un des exemples les plus marquants est celui de la ribavirine, un antiviral à large spectre très prometteur capable d'inhiber de nombreux virus ADN et ARN [35] [36], mais dont la forte cytotoxicité chez le chat [37] n'a pas permis son autorisation sur le marché vétérinaire.

De plus, pour qu'une molécule antivirale démontre tout son potentiel anti-infectieux, il faut l'utiliser dans les premiers temps de l'infection. Or, lorsqu'un animal présente des symptômes, l'infection est déjà aigüe. A ce stade, le seul recours aux antiviraux n'est plus assez efficace pour stopper la maladie, et des traitements accessoires sont mis en place pour lutter contre les signes cliniques. De ce fait, afin de rendre les animaux moins sensibles aux infections virales et ainsi préserver l'économie agro-alimentaire, la recherche vétérinaire et les industries pharmaceutiques ont préféré orienter leur travail vers le développement de médecines préventives, et plus particulièrement la vaccination.

Cependant, alors que l'apparition du SIDA a fait entrer l'Homme dans l'une des plus grandes crises sanitaires du XXème siècle, la nécessité de découvrir un traitement pour lutter contre le VIH insuffle une nouvelle dynamique à la recherche vétérinaire : celle d'utiliser les virus animaux pour mieux comprendre les virus affectant l'Homme. Alors que l'utilisation des primates pour l'étude du VIH est compliquée par le fait que la plupart des singes étudiés ne développent pas de symptômes d'immunodéficience après injection de VIH [38] [39], la découverte d'un virus induisant une immunodéficience chez le chat en 1986 amène de nouvelles perspectives d'étude [40]. De nombreux travaux sont ainsi menés pour étudier le virus de l'immunodéficience féline (FIV), révélant plusieurs similitudes avec le VIH, et faisant ainsi du FIV un modèle de choix pour la découverte et l'étude de nouveaux traitements [41] [42]. De nombreuses molécules antivirales ont ainsi été testées sur le FIV, dont la plupart ont été, ou sont encore, utilisées chez l'Homme pour lutter contre le VIH [43] (Tableau 2).

Nom	Classe Thérapeutique	Efficacité contre FIV <i>in vitro</i>	Efficacité contre FIV <i>in vivo</i>	Traitement anti-VIH pour l'Homme
Zidovudine		Oui	Oui	Oui (1987)
Stavudine		Oui	Non démontrée	Oui (1994)
Didanosine		Oui	Oui	Oui (1991)
Zalcitabine	Analogues nucléosidiques	Oui	Non démontrée	Oui (1992)
Lamivudine		Oui	Non	Oui (1995)
Emtricitabine		Oui	Non démontrée	Oui (2003)
Abacavir		Oui	Non démontrée	Oui (1998)
Adéfovir	Analogues nucléotidiques	Oui	Non	Oui (2002)
Ténofovir		Oui	Non	Oui (2001)
Foscarnet	Inhibiteurs de la synthèse des nucléotides	Oui	Non démontrée	Non
Ribavirin		Oui	Non démontrée	Non
Plerixafor	Inhibiteur d'entrée	Oui	Oui	Non
Tripanavir	Inhibiteurs des protéases	Oui	Non démontrée	Oui (2005)
Lopinavir		Oui	Non démontrée	Oui (2000)
Atazanavir		Oui	Non démontrée	Oui (2003)
Raltegravir	Inhibiteur de l'intégrase	Oui	Non démontrée	Oui (2007)
h-IFN α	Interférons	Oui	Non	Oui
f-IFN ω		Oui	Oui	Non

Tableau 2. Liste des composés testés contre le FIV et leur application chez l'Homme.

FIV : virus de l'immunodéficience féline. VIH : virus de l'immunodéficience humaine. h-IFN α : interféron humain alpha. f-IFN ω : interféron félin oméga. Les dates entre parenthèses correspondent à la date d'approbation par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA). Inspiré de De Clercq et al. 2016 [28] et de Hartman et al. 2015 [43].

Parallèlement aux épidémies auxquelles l'Homme a dû faire face, l'accroissement de la population mondiale et ses besoins de plus en plus importants en protéines, ainsi que le changement de statut des animaux ont également participé à l'avancée de la recherche antivirale vétérinaire. Principalement considérés pour leur utilité jusqu'au début des années 1980s, les animaux domestiques, tels que le chien ou le chat, sont de plus en plus considérés comme des animaux de compagnie, et voire, pour la plupart d'entre nous, comme des membres de la famille à part entière [44]. Cette évolution majeure a favorisé le développement d'un nouveau marché :

celui des animaux domestiques, aussi appelé « *petcare* ». Ce marché, qui regroupe l'ensemble des dépenses nécessaires pour l'alimentation, les soins, et les loisirs des animaux domestiques, n'a cessé d'augmenter ces dix dernières années pour atteindre près de 5 milliards d'euros en 2020 (étude Xerfi 2018 [45]). Pour répondre aux attentes des propriétaires et améliorer la santé de leurs animaux, la médecine vétérinaire a ainsi dû évoluer. Par le développement d'outils diagnostiques plus performants, et l'identification des maladies à des stades d'infection encore précoces, l'utilisation de la chimiothérapie antivirale devient envisageable pour l'animal. Cependant, même si le marché vétérinaire s'est fortement développé et attire grandement l'intérêt de l'industrie pharmaceutique, cette dernière préfère toujours orienter ses études de recherche et développement (R&D) au développement de vaccins [46]. La recherche de molécules antivirales pour une utilisation vétérinaire ne se développe pas, et le traitement des infections virales animales se fait donc à l'aide d'antiviraux à visée humaine (Tableau 3).

Nom	Classe	Virus	Espèce(s)
Iodoxuridine	Analogues nucléotidiques	FHV-1	Chat
Trifluridine		FHV-1	Chat
Acyclovir	Analogues nucléosidiques acycliques	FHV-1	Chat
Valacyclovir		FHV-1 ; HVE-1	Chat ; Cheval
Ganciclovir		HVE-1	Cheval
Valganciclovir		HVE-1	Cheval
Penciclovir		FHV-1	Chat
Famciclovir		FHV-1	Chat
Brivudine		FHV-1	Chat
Cyclosporine A	Cyclosporines	FIPV	Chat
Interféron félin ω	Interférons	FIV ; CPV	Chat ; Chien

Tableau 3. Principaux antiviraux utilisés en médecine vétérinaire.

FHV-1 : herpèsvirus félin de type 1. HVE-1 : herpèsvirus équin de type 1. FIPV : virus de la péritonite infectieuse féline. FIV : virus de l'immunodéficience féline. CPV : virus de la parvovirose canine. Inspiré de Bassière.2017 [47].

II.3 Importance de la recherche antivirale vétérinaire

Comme nous l'avons vu précédemment, la recherche d'antiviraux vétérinaires a été mise de côté au profit de la vaccination. Cependant, même si la vaccination a une réelle importance et a connu de grands succès, tels que l'éradication de la peste bovine en 2011 [48], il est nécessaire que vaccins et antiviraux soient utilisés de manière complémentaire afin de protéger plus efficacement les populations humaines et animales, ainsi que toute l'économie qui en découle. La recherche d'antiviraux à visée vétérinaire doit donc être poursuivie afin de pouvoir amener de nouvelles solutions thérapeutiques.

II.3.1 Optimiser et renforcer le contrôle des épizooties

L'une des premières raisons pour laquelle la recherche antivirale vétérinaire ne doit pas être oubliée est que, souvent, la protection induite par la vaccination n'est pas optimale. En effet, le principal rôle de la vaccination est de stimuler le système immunitaire pour réduire l'apparition des signes cliniques, afin que l'animal ne développe pas la maladie. Cependant, elle protège rarement contre l'infection virale en elle-même, ce qui signifie que, le plus souvent, malgré les campagnes de vaccination, les virus continuent de circuler au sein des populations vaccinées, ce qui peut être le point de départ d'une épizootie [49] [50].

L'un des exemples les plus parlants de cette limitation est celui du virus responsable de la maladie de Marek (MDV). La maladie de Marek est une infection mondialement répandue qui induit l'apparition de lymphomes chez les volailles, entraînant près de 100% de mortalité, et qui a un fort impact économique puisqu'il représente environ 1 à 2 milliards de dollars de pertes par an aux Etats-Unis [51]. Avant le développement d'un vaccin, les nombreuses épizooties de MDV ont entraîné d'importantes pertes économiques à travers le monde. Le premier vaccin a été développé peu de temps après la découverte du MDV, mais il n'a été que peu utilisé, la préférence allant à celui développé en 1970 et contenant une souche dérivée de l'herpèsvirus de dinde (HVT). Cependant, alors que la vaccination permet de fortement diminuer les pertes animales et économiques, elle ne contrôle pas le niveau d'infection des animaux. Cumulée avec les conditions d'élevage et la grande proximité des animaux entre eux, la circulation invisible de ce virus au sein de populations vaccinées favorise une pression de sélection, responsable de l'apparition de nouveaux variants de plus forte virulence, et le point de départ de nouvelles épizooties [52] [53] (Figure 9).

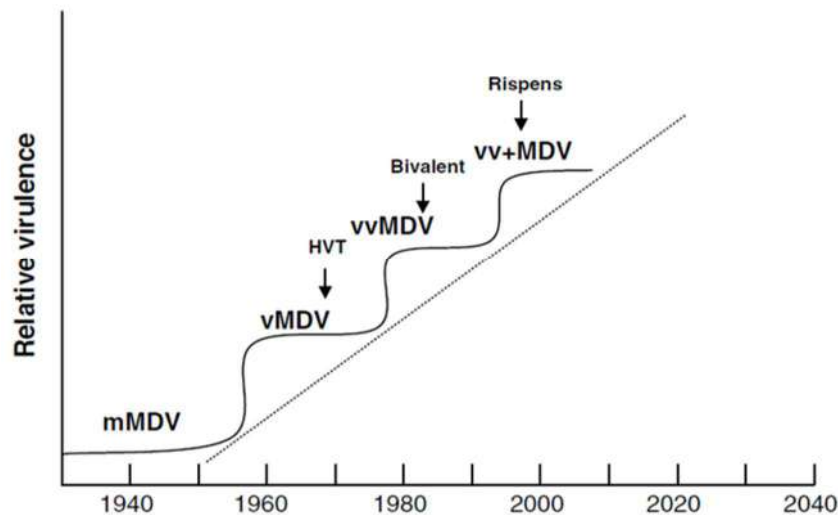


Figure 9. Evolution de la virulence du virus de la maladie de Marek.

Etude de la virulence du virus de la maladie de Marek à la suite des différentes campagnes de vaccination entre 1969 et 2005. mMDV : MDV modéré ; vMDV : MDV virulent ; vvMDV : MDV très virulent ; VV+MDV : MDV très virulent + ; HVT : vaccin développé à partir d'un herpèsvirus de dinde ; Bivalent : vaccin composé de la souche HVT et du sérotype 2 de MDV ; Rispens : vaccin contenant la souche MDV CVI988 [53].

Dans ce contexte, où la vaccination seule ne suffit pas à contrôler une épizootie, ou bien n'existe pas, le recours aux antiviraux pourrait se révéler indispensable pour limiter la diffusion du virus et réduire l'impact économique d'une épizootie [54].

De plus, avec la menace que représente l'émergence de nouvelles maladies, qui sont, dans 75% des cas, virales et d'origine animale [55] (Tableau 1), il est essentiel d'orienter la recherche vers les virus animaux, afin de pouvoir rapidement mettre en place des solutions thérapeutiques lorsqu'une épidémie se déclare. Une meilleure compréhension de leurs mécanismes virologiques ainsi que l'étude de molécules antivirales contre ces virus animaux pourraient ainsi représenter des nouvelles perspectives très intéressantes pour la lutte contre les maladies émergentes, afin de cloisonner les épidémies et éviter l'apparition de nouvelles pandémies. Cette stratégie pourrait également être utile dans la lutte contre le bioterrorisme. En effet, la plupart des agents pathogènes ayant été utilisés comme arme biologique dans le passé, ou pouvant représenter une menace majeure sont zoonotiques, c'est-à-dire transmissible de l'animal à l'Homme [56]. Un des agents pathogènes les plus importants ayant existé chez l'Homme est le virus de la variole (VARV). La variole est une maladie induisant l'apparition de lésions sur l'ensemble du corps et qui se caractérise un taux de mortalité important d'environ 30% [57]. Grâce à la vaccination, cette maladie a été éradiquée en 1980, et le virus ne circule

plus de nos jours. Cependant, même si ce virus n'est plus présent à l'heure actuelle, (hormis au sein des laboratoires du Centre de contrôle et de prévention des maladies à Atlanta et du centre de recherche en virologie de Koltosovo en Russie), ses homologues chez l'animal pourraient constituer de nouvelles armes biologiques. Une attention particulière a notamment été portée sur le virus de la variole du singe : le monkeypox (MPXV). Le monkeypox a été identifié pour la première fois à la fin des années 1950, et induit les mêmes symptômes chez le singe que la variole chez l'Homme. Tout d'abord considéré comme un virus spécifiquement animal, plusieurs épidémies en République démocratique du Congo ont démontré le caractère zoonotique de ce virus [58]. De par son assez faible capacité de transmission inter-humaine, le monkeypox n'est pas considéré comme un agent pathogène majeur chez l'Homme. En revanche, même si cette transmission reste rare, elle est quand même présente et doit être prise au sérieux, sachant que le MPXV et la VARV possèdent de fortes similitudes génomiques et que le premier démontre actuellement un fort potentiel de ré-émergence dans les zones géographiques historiquement touchées (Afrique centrale et de l'ouest) [58]. De plus, des études ont démontré que l'ajout du gène IL4 chez différents poxvirus pouvait grandement augmenter leur virulence [59] [60]. Il est ainsi facile d'imaginer qu'un MPXV modifié avec ce gène pourrait représenter une arme biologique très importante, surtout que le taux de mortalité du MPXV chez l'Homme peut atteindre 10% et que la jeune population ne possède plus d'immunité vaccinale contre les *Orthopoxvirus* suite à l'arrêt de la vaccination anti-variologique. L'étude d'orthopoxvirus non zoonotiques, tels que le virus de l'électromélie (mousepox) qui infecte uniquement les rongeurs, est un exemple qui permet ainsi de mieux connaître ces virus et de mettre en œuvre des solutions de traitement efficace pour la lutte contre les orthopoxvirus émergents et le bioterrorisme [61].

II.3.2 Réduire la cytotoxicité des antiviraux actuels, optimiser leur efficacité et surmonter les résistances virales

La deuxième raison pour laquelle il est important de poursuivre la recherche d'antiviraux pour la médecine vétérinaire est que de nombreux antiviraux développés pour une application chez l'Homme n'ont pas été optimisés pour une application chez l'animal.

En effet, de nombreuses molécules antivirales présentent une toxicité *in vivo*, notamment pour le chat, chez lequel l'idoxuridine, la ribavirine, l'acyclovir, le ganciclovir et leurs prodrogues respectives ne peuvent pas être utilisées, hormis dans le cadre strict d'une application topique [62].

Ainsi, le recours aux antiviraux pour traiter les infections animales est uniquement envisagé lorsque le risque lié à leur toxicité est plus faible que celui induit par les symptômes de la maladie, c'est-à-dire lorsque l'infection est déjà très prononcée et que la survie de l'animal est en jeu.

De plus, lorsque les antiviraux actuels ne sont pas toxiques, ils présentent souvent une faible activité antivirale *in vivo*, à cause de leur faible biodisponibilité chez l'animal, ce qui nécessite que le traitement soit administré plusieurs fois par jour pour obtenir une activité antivirale [63] [64].

Enfin, l'utilisation répétée de certains antiviraux, tels que l'acyclovir notamment, a entraîné l'apparition de souches résistantes pour lesquelles les traitements actuels ne sont pas efficaces. Ainsi, comme pour l'Homme, le traitement à l'aide d'administrations répétées de molécules antivirales pourrait fortement entraîner l'apparition de souches résistantes.

Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches afin de pouvoir proposer des traitements efficaces et mieux adaptés à la médecine vétérinaire.

Au final, la recherche de moyens thérapeutiques, tels que les antiviraux, est un enjeu majeur pour la santé humaine, animale et l'économie mondiale. Cependant, pour que la recherche antivirale progresse, il est nécessaire de disposer des outils d'étude et de quantification performants.

III. Techniques de virologie pour la découverte de molécules antivirales

Avec le développement des techniques de culture cellulaire et l'apparition de premières cultures de virus dans les années 1950, la virologie a connu un nouvel essor, et les méthodes d'étude des virus n'ont cessé d'évoluer et de devenir plus performantes, parallèlement aux progrès de la biologie moléculaire et de l'imagerie.

III.1 Méthodes conventionnelles

Les principales techniques *in vitro* utilisées pour la quantification et la découverte de molécules antivirales peuvent être réparties en plusieurs catégories [65] [66]:

- méthodes permettant de mesurer l'infectivité d'un virus, c'est-à-dire mesurer les capacités d'un virus à infecter des cellules et à produire des nouvelles particules ;
- techniques permettant de quantifier les acides nucléiques ou les protéines.

Deux techniques sont utilisées en routine pour mesurer l'infectivité virale en culture cellulaire : la méthode des plages de lyse et celle des dilutions limites.

III.1.1 Etude des plages de lyses (*plaque assay*)

Développée dans les années 1950 par Renato Dulbecco, la méthode des plages de lyse est l'une des plus anciennes techniques d'étude des virus, et est encore couramment utilisée en routine de nos jours pour purifier ou calculer le titre viral d'une production [67] [68], ainsi que pour étudier l'activité antivirale de molécules [69] [70].

Cette méthode est uniquement applicable aux virus lytiques *in vitro* dont l'effet cytopathique induit se manifeste par la formation de plages de lyse (ou de lésions équivalentes). Une fois que la cellule est infectée, le virus va s'y multiplier puis infecter les cellules voisines en induisant leur lyse. Ainsi, lorsque ce processus se répète et qu'un groupe de cellules se retrouve lysé, il y a formation d'une plage de lyse facilement observable. Fondé sur ce principe, la technique des plages de lyse consiste à infecter un tapis cellulaire, et, après un certain temps d'incubation, à le recouvrir avec un milieu gélosé. L'ajout de ce milieu gélosé, le plus souvent réalisé à base d'agarose, permet ainsi de limiter la transmission de particules virales d'une cellule infectée aux cellules voisines uniquement, afin que la plage de lyse formée soit le résultat de l'infection initiale d'une cellule (en théorie, par une seule particule virale contenue dans l'inoculum). A la fin de l'expérience, le milieu gélosé peut être retiré pour coloration avec du cristal violet afin que les plages soient plus facilement identifiables. Les plages de lyse sont ensuite comptées, et le titre viral est exprimé en *plaque forming unit* (PFU) (ou UFP en français) par volume (Figure 10).

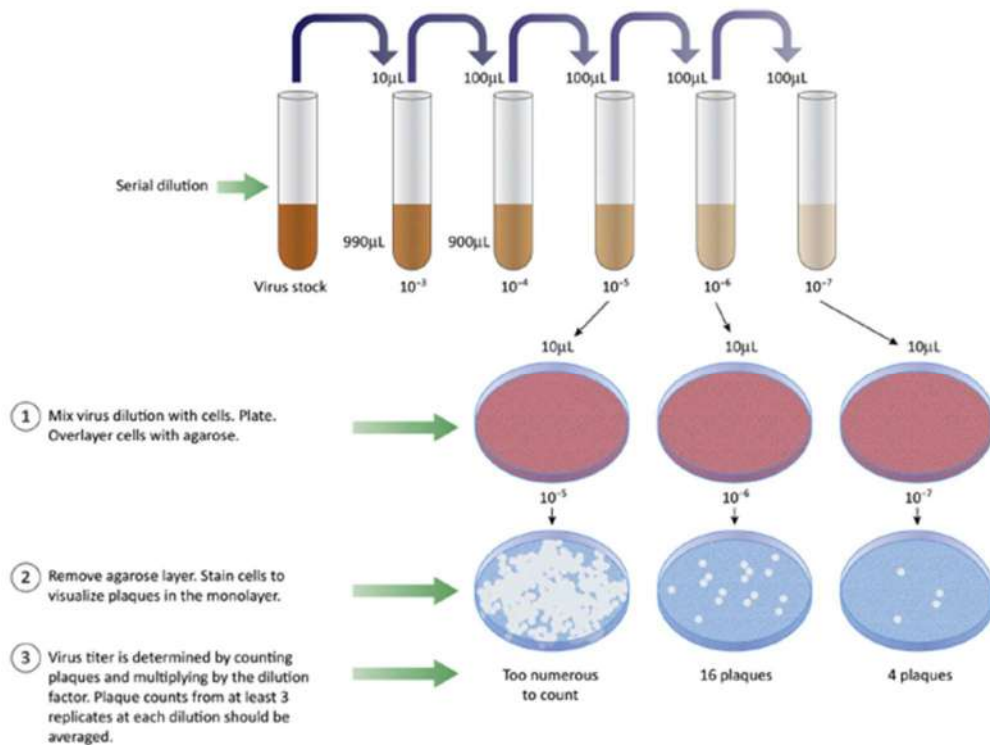


Figure 10. Exemple de quantification par plages de lyse.

Des dilutions en série du stock viral sont réalisées, et chacune d'entre elle est utilisée pour infecter un tapis cellulaire. Après infection, le tapis cellulaire est recouvert d'un milieu gélosé. Au bout d'un temps d'incubation propre à chaque virus, le milieu gélosé est retiré et les cellules sont colorées au cristal violet. Suite à cela, une dilution pour laquelle les plages sont suffisamment éloignées les unes des autres est choisie, et les plages sont comptées [65].

Les avantages de cette technique sont qu'elle est tout d'abord très facile à mettre en place, qu'elle ne demande pas beaucoup de consommables et a ainsi un coût plus que modéré. Cependant, par l'utilisation de dilutions et le comptage manuel des plages, cette technique est une méthode laborieuse pour les expérimentateurs. De plus, l'apparition des plages de lyse sous agarose nécessite une incubation de plusieurs jours, voire plusieurs semaines, selon les virus, ce qui ne permet pas d'obtenir des résultats rapidement.

III.1.2 Quantification par dilution limite

La méthode des dilutions limites, ou *end point dilution assay*, est également une des premières techniques de virologie à avoir été développée.

Contrairement à l'étude des plages de lyse, la quantification par dilution limite n'est théoriquement pas limitée qu'aux virus lytiques. En effet, cette technique ne mesure pas le nombre de plages de lyse, mais la présence ou non d'effet cytopathique (ECP), dont l'intensité et la nature sont variées (d'un changement morphologique des cellules induit par l'infection virale à la lyse totale). Applicable *in vitro* sur culture cellulaire, le *end point dilution assay* permet de déterminer la concentration de virus pour laquelle la moitié des conditions présentent un ECP (Figure 11). On parle ainsi de TCID₅₀ (*tissue culture dose 50*) par unité de volume [65] [66].

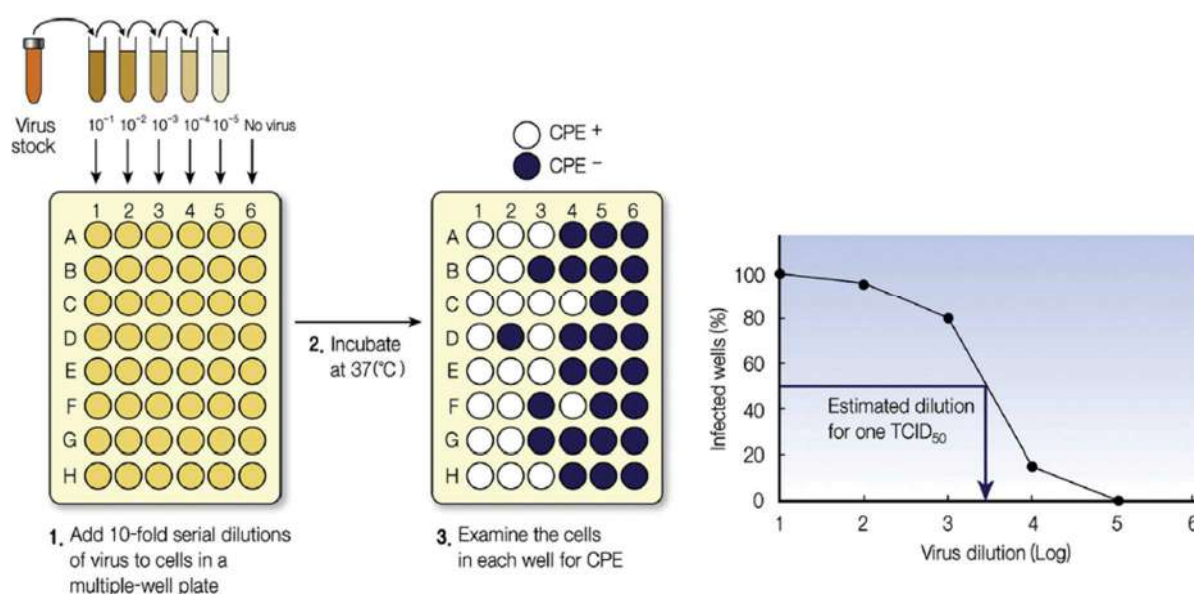


Figure 11. Exemple de quantification par dilution limite.

Après infection des cellules avec des dilutions en série du stock viral, l'absence (ronds noirs) ou la présence (ronds blancs) d'ECP dans chacun des puits est comptabilisée permettant ainsi d'obtenir le pourcentage d'infection pour chaque dilution. La TCID₅₀ peut ensuite être déterminée par différentes formules mathématiques [66].

Notamment utilisée pour déterminer le titre viral, la TCID₅₀ est également appliquée en routine pour déterminer l'activité antivirale de composés [71] [72]. Cependant, tout comme l'étude des plages de lyse, cette méthode est laborieuse puisqu'elle nécessite que chaque condition soit observée individuellement. Par conséquent, ces deux techniques sont compliquées à mettre en place pour étudier l'activité antivirale de nombreuses molécules au sein d'un seul essai biologique.

Même si l'étude des plages de lyse ou la méthode des dilutions limites sont considérées comme les techniques de référence dans le domaine de la virologie, l'essor de la biologie moléculaire et de la chimie a permis le développement de nouveaux outils, dont certains tendent à devenir les nouvelles méthodes de référence pour la quantification virale.

III.1.3 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *polymerase chain reaction*) est l'une des techniques de biologie moléculaire les plus révolutionnaires du XX^{ème} siècle. Développée en 1985 et récompensée d'un prix Nobel en 1993, cette méthode permet l'amplification d'un fragment d'ADN à partir d'amorces spécifiques, et est notamment utilisée comme outil de diagnostic des agents pathogènes [73]. Pour cela, les deux brins d'ADN sont tout d'abord séparés sous l'action de la chaleur : c'est l'étape de dénaturation. Une fois les brins d'ADN séparés, les amorces spécifiques vont venir s'hybrider sur la matrice d'ADN simple brin, pour permettre ensuite la polymérisation des nouveaux fragments d'ADN et leur amplification. La répétition de ces étapes pendant 25 à 40 cycles permet ainsi d'obtenir une très grande quantité du fragment d'intérêt (Figure 12).

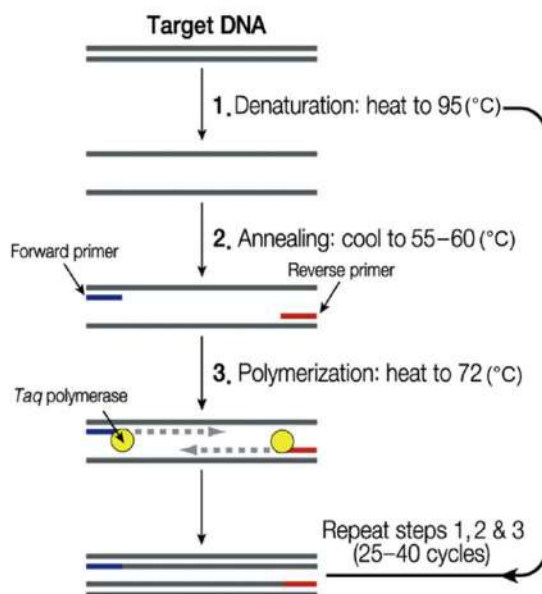


Figure 12. Etapes de la PCR.

1-Dénaturation : l'ADN est chauffé à 95°C pour séparer les deux brins d'ADN. 2- Hybridation : les amorces s'hybrident sur leur brin d'ADN respectif grâce à une température qui leur est spécifique. 3- Polymérisation : la température remonte à 72°C pour permettre l'action de l'ADN polymérase qui permet la polymérisation et la formation des nouveaux brins d'ADN. A la fin de cette étape, la quantité d'ADN a été multipliée par deux. Ces trois étapes sont répétées 25 à 40 fois [66].

Avec le développement perpétuel de la biologie moléculaire, les techniques de PCR se sont optimisées, et une variante de la PCR, appelée PCR quantitative (qPCR) se révèle être un outil essentiel pour la virologie. Fondée sur le même principe que la PCR, la qPCR permet à la fois la détection et la quantification d'un fragment d'intérêt. Pour cela, des systèmes de détection de l'ADN sont ajoutés au mélange réactionnel. A l'heure actuelle, deux principaux systèmes sont utilisés : un système de détection non spécifique (SYBR Green) et un système spécifique pour le fragment d'intérêt (sondes Taqman). Le SYBR Green est un agent intercalant qui se fixe à l'ADN lorsque celui-ci est sous sa forme double brin, entraînant ainsi l'émission de fluorescence et la détection des fragments amplifiés. Les sondes Taqman, quant à elles, sont des fragments d'ADN spécifiques comprenant un fluorophore à leur extrémité 5' et une molécule retenant l'émission de fluorescence à leur extrémité 3'. Lors de l'hybridation, ces sondes vont venir se fixer sur le brin d'ADN d'intérêt en même temps que les amorces. Ensuite, lors de l'élongation, la polymérase va dissocier le fluorophore du reste de la sonde, ce qui va permettre l'expression de la fluorescence et ainsi la détection de l'ADN nouvellement synthétisé [74] (Figure 13).

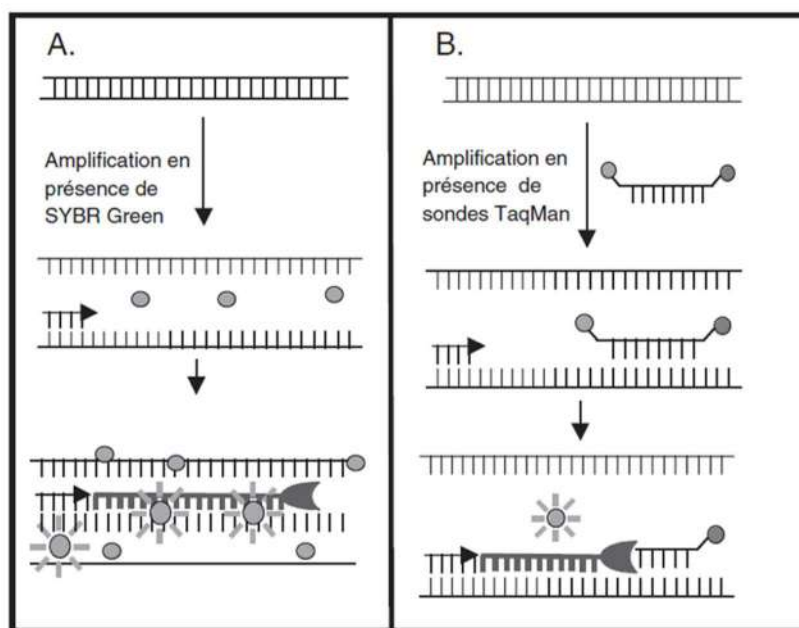


Figure 13. Principaux systèmes utilisés en qPCR.

A. SYBR Green. L'émission de fluorescence a lieu pendant l'élongation, lorsque le SYBR Green s'intègre à l'ADN double brin. B. Sondes Taqman. Les sondes s'intègrent à l'ADN simple brin lors de la phase d'hybridation. La dissociation entre le fluorophore et le reste de la sonde induite par la polymérase permet l'expression de la fluorescence lors de la phase d'élongation [74].

La détection et la quantification des molécules d'ARN est également possible. Pour cela, une étape de transcription inverse est ajoutée au début du cycle pour rétro-transcrire l'ARN en ADN. On parle alors de *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) ou de *reverse transcriptase* qPCR (RT-qPCR).

Par sa rapidité et sa précision, la qPCR est devenu un outil indispensable en virologie pour la détection précoce des micro-organismes et la quantification des acides nucléiques, et est l'une des méthodes, voire la méthode la plus utilisée à ce jour pour étudier l'activité de molécules antivirales [75] [76] [77] [78]. Cependant, cette technique ne permet pas de savoir si les particules virales sont infectieuses. De plus, par la nécessité d'extraction de chaque condition et le prix élevé des différents réactifs, l'utilisation de cette technique est assez laborieuse et a un coût non négligeable pouvant freiner son utilisation pour la découverte d'antiviraux à grande échelle.

III.1.4 Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique de détection et de quantification qui peut être appliquée à tout type de virus, qu'il soit lytique ou non, avec ou sans formation d'effet cytopathique, et qui permet de marquer une protéine virale d'intérêt, voire même les acides nucléiques [79]. Pour cela, l'immunofluorescence utilise un anticorps spécifique de la protéine ou de l'acide nucléique d'intérêt, couplé à un fluorophore. Selon que l'immunofluorescence est directe ou indirecte, le fluorophore est respectivement couplé à l'anticorps primaire ou à l'anticorps secondaire (Figure 14). Lorsque l'anticorps couplé à la protéine fluorescente se fixe sur sa cible, il y a émission de fluorescence, ce qui permet de détecter la cible d'intérêt et sa localisation à l'intérieur de la cellule par microscopie à fluorescence [80].

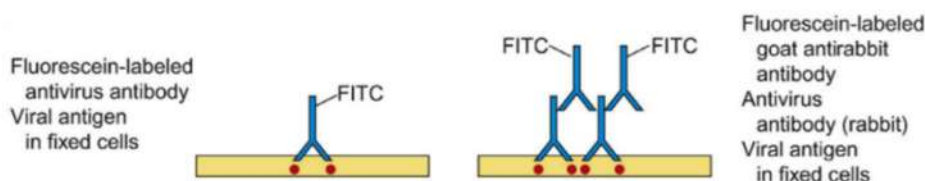


Figure 14. Principe de l'immunofluorescence.

Rouge : protéine cible. Bleu : anticorps. Gauche : immunofluorescence directe. La détection est réalisée par la fixation d'un anticorps primaire couplé à un fluorophore. Droite : immunofluorescence indirecte en deux étapes. L'anticorps primaire reconnaît et se fixe sur la protéine cible. La détection a lieu lorsque l'anticorps secondaire couplé à une protéine fluorescente reconnaît et vient se fixer sur l'anticorps primaire [80].

Par l'obtention de données quantitatives précises, comme le nombre de cellules infectées et la localisation de la protéine d'intérêt, et de données qualitatives par l'imagerie, l'immunofluorescence est une technique de grande sensibilité et rapide à mettre en place qui est très intéressante dans le domaine de la virologie, autant pour les études fondamentales que pour l'étude d'activités antivirales [81]. Cependant, à cause du prix élevé des anticorps, l'immunofluorescence est une méthode onéreuse.

III.2 Mesure de l'impédance comme nouvelle méthode d'étude

Par la nécessité d'analyser les cellules avec des méthodes de moins en moins invasives, une nouvelle technique, fondée sur la variation du flux électrique s'est développée : l'impédancemétrie, et notamment le système Real Time Cellular Analysis xCELLigence (RTCA). Ce système, développé par ACEA Biosciences (Agilent), mesure le courant électrique traversant un tapis cellulaire et permet de suivre en temps réel le comportement des cellules et leur réaction face à divers stimuli. Pour cela, des plaques spéciales sont utilisées, dont les puits sont recouverts d'électrodes en or. Un courant électrique de faible voltage est ensuite appliqué entre le pôle négatif et positif, et le signal électrique passant entre ces deux extrémités est mesuré en temps réel. Lorsque les cellules sont ajoutées, elles vont progressivement adhérer sur les électrodes ce qui va entraîner une modification du signal électrique (Figure 15) [82] [83].

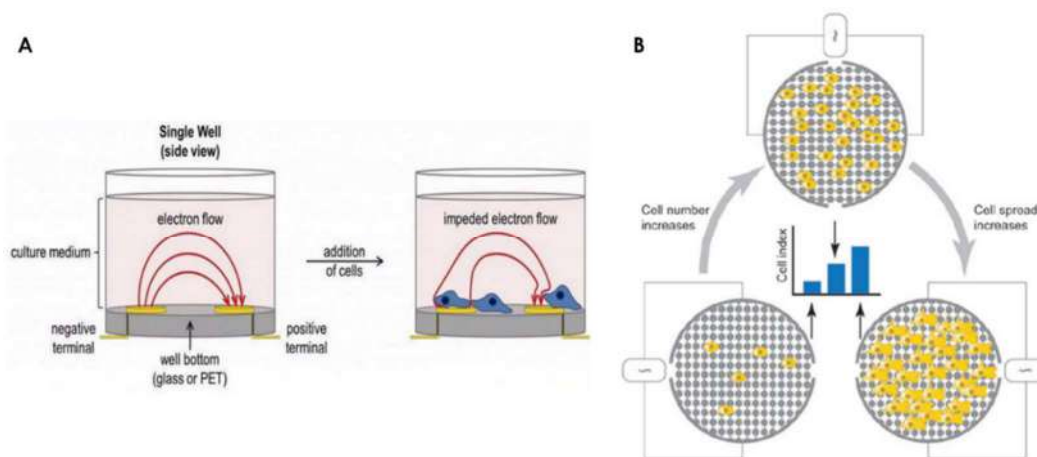


Figure 15. Principe du RTCA xCELLigence.

A. Puits d'une plaque de RTCA. Des électrodes en or sont fixées au fond de chaque puits. Le milieu permet de conduire un courant électrique entre les électrodes chargées négativement et les électrodes chargées positivement. Lorsque les cellules adhèrent au fond des puits, le courant électrique est alors modifié. Schéma : <https://www.agilent.com/en/technology/cellular-impedance>. B. Impact de la confluence et de l'adhérence des cellules sur le signal électrique. Plus les cellules sont nombreuses et adhérentes et plus l'impédance augmente. La valeur du signal électrique est automatiquement transformée en valeur de cell index par l'analyseur de cellule [83].

Ainsi, les valeurs du signal électrique seront différentes selon le nombre et l'adhérence des cellules, ce qui permet de suivre en temps réel la prolifération cellulaire (Figure 16).

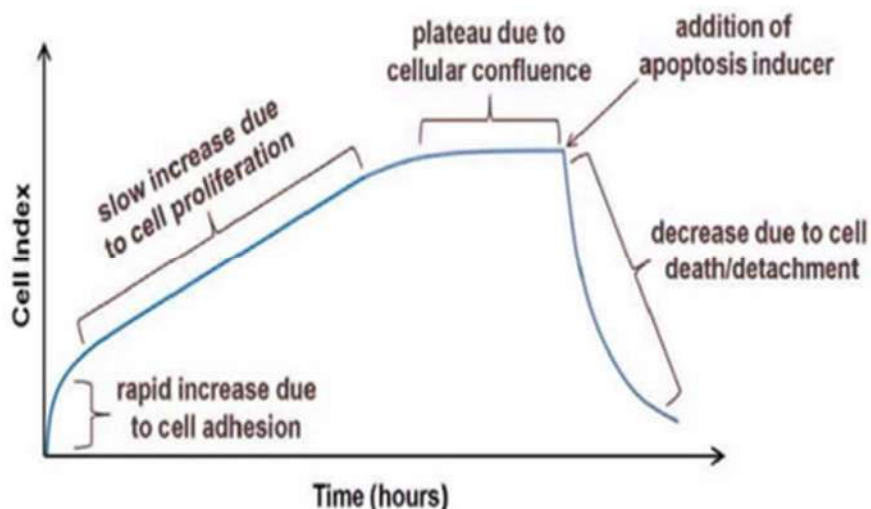


Figure 16. Evolution du cell index en fonction de l'état prolifératif des cellules.

(<https://www.agilent.com/en/technology/cellular-impedance>)

L'impédancemétrie a donc surtout été utilisée pour étudier la prolifération et l'adhésion cellulaire [84], mais elle est également utilisée pour déterminer la cytotoxicité de certains composés [85], et pour étudier la migration cellulaire [83]. Récemment, la RTCA xCELLingence a été appliquée à un nouveau domaine : la virologie [86]. En effet, l'effet cytopathique induit par l'infection virale provoque rapidement un changement de morphologie, et par conséquent d'adhérence des cellules, puis la mort cellulaire lorsque l'infection est très poussée. Ainsi, des études ont démontrés le potentiel de l'impédancemétrie pour l'étude de molécules antivirales [87] [88].

Par sa facilité de mise en pratique, sa robustesse, la rapidité d'acquisition des résultats et par la possibilité d'observer l'action antivirale de composés en temps réel, l'impédancemétrie pourrait devenir une technique de choix pour la découverte de molécules antivirales. Cependant, même si cette technique se révèle très intéressante elle ne mesure pas directement un processus viral mais plutôt les conséquences de celui-ci. De plus, le coût des réactifs, et notamment des plaques reste élevé.

III.3 Repositionnement de composés et criblage à haut contenu pour la découverte rapide de molécules antivirales

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, il est nécessaire que la recherche de molécules antivirales s'accélère. Le développement de nouvelles molécules étant un processus long et fastidieux, la recherche s'est tournée vers le repositionnement de composés pour accélérer la découverte de nouvelles activités antivirales [89]. Le repositionnement de composés consiste à définir une nouvelle application à des molécules qui possèdent déjà une autorisation de mise sur le marché. Ainsi, par l'utilisation de molécules déjà développées, le repositionnement de composés permet de s'affranchir de la longue phase de développement, et de commencer directement en phase pré-clinique. De plus, par leur autorisation de mise sur le marché, ces composés ont déjà validé les phases d'essais cliniques, ce qui signifie que les données toxicologiques et pharmacologiques de ces composés sont déjà connues, et qu'il ne sera pas nécessaire de refaire des phases cliniques dans le cadre d'une nouvelle indication. La mise sur le marché de ces molécules repositionnées comme antiviraux est par conséquent beaucoup plus rapide. En revanche, l'approbation d'une haute autorité de santé ne permet l'utilisation d'une molécule que pour une dose précise de médicament. Si un composé approuvé démontre une activité antivirale à des concentrations supérieures à celles étudiées pour la première indication, il faudra effectuer de nouvelles phases cliniques, ralentissant ainsi sa mise sur le marché.

Par son coût et son temps de développement considérablement réduits par rapport au développement d'une nouvelle molécule, le repositionnement de composés est devenu une solution de choix pour l'identification rapide d'antiviraux.

Cependant, le repositionnement de composés fait souvent appel à des tests de chimiothèques complètes comprenant des milliers de composés. Ainsi, le criblage de ces banques nécessite d'avoir des outils applicables au haut contenu (HCS, *high content screening*), c'est-à-dire des techniques faciles à mettre en œuvre, avec des résultats rapides et à faible coût. Par sa capacité à tester des milliers de molécules dans un même essai biologique, le HCS est devenu une des techniques de référence pour une identification rapide de composés [90], et est de plus en plus appliqué dans le domaine de la virologie, notamment de nos jours avec la pandémie de SARS-CoV2, et a déjà été utilisé pour tester l'activité de milliers de molécules sur le SARS, la dengue, ou encore le cytomégalovirus humain [91] [92] [93].

En revanche, avec les milliers de molécules à tester en même temps, le criblage à haut contenu ne peut pas être utilisé avec toutes les techniques virologiques décrites auparavant. En effet, par le nombre important de conditions qu'elles nécessitent et la quantification manuelle qu'elles requièrent, il n'est pas possible d'utiliser la méthode des plages de lyse ou celle des dilutions limites pour des criblages à grande échelle. Grâce à sa rapidité et sa précision, la qPCR pourrait être envisagée pour l'étude de molécules antivirales à haut contenu. Mais, même si l'étape d'extraction peut être facilitée par l'utilisation de robots extracteurs, la qPCR reste une technique laborieuse pour cribler des milliers de molécules à la fois. En revanche, l'immunofluorescence est une technique qui a déjà fait ses preuves lors de campagnes de criblage à haut contenu [92] [94]. En effet, par l'utilisation de la fluorescence, cette technique peut facilement être combinée avec des microscopes à haut débit, permettant ainsi d'automatiser la quantification et d'effectuer des analyses multiparamétriques. Cependant, l'importante quantité d'anticorps nécessaire pour de telles expériences fait de l'immunofluorescence à haut débit une technique à fort coût d'investissement pour les laboratoires.

Le potentiel de la RTCA xCELLigence comme nouvel outil applicable au HCS a récemment été démontré [95] et a ensuite permis de tester près de 3000 composés contre HVE-1 lors d'une campagne de criblage à haut contenu [96]. Ainsi, bien qu'elle ne mesure pas directement un processus viral, la RTCA pourrait devenir l'une des techniques de référence pour la mise en lumière rapide de nouvelles activités antivirales.

Même si le domaine de la virologie possède de nombreuses méthodes pour l'étude des virus et leur quantification, celles-ci ne sont pas forcément applicables pour une recherche rapide d'antiviraux lors de grandes campagnes de repositionnement de composés. Et les seules techniques qui peuvent être utilisés lors de criblage à haut contenu sont trop chères ou ne quantifient pas directement un processus virologique (Tableau 4).

Résultats ¹	Paramètre observé	Mesure d'un processus viral	Travail fastidieux	Coût	Applicable en HCS	
Plages de lyse	Semaines	Plages de lyse	Oui	Oui	Faible	Non
Dilutions limites	Semaines	ECP	Oui	Oui	Faible	Non
qPCR	Jours	Acides nucléiques	Oui	Oui	Elevé	Non
IF	Jours	Protéines virales	Oui	Oui	Très élevé	Oui
RTCA	Jours	Signal électrique	Non	Non	Modéré	Oui

Tableau 4. Principales caractéristiques des principales techniques virologiques et leur application pour le criblage à haut contenu.

¹ prend en compte le temps total de l'expérience (ensemencement des cellules, traitement-infection, étapes post-infection et quantification). IF : immunofluorescence.

Ainsi, il n'existe pas encore de technique combinant quantification de processus viraux et criblage à haut contenu, le tout étant facile à mettre en œuvre et à un prix raisonnable. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches pour développer de nouvelles méthodes d'étude et de quantification des virus.

IV. Technologie ANCHOR™ : un nouvel outil pour le suivi du cycle viral en temps réel

Comme nous venons de le voir, peu de techniques virologiques actuelles sont compatibles avec de la quantification à grande échelle, et aucune d'entre elles ne permet de visualiser précisément ce qu'il se passe à l'intérieur de la cellule en temps réel, notamment à cause de la difficulté à observer l'ADN à l'intérieur des cellules vivantes.

Avec l'expansion des protéines fluorescentes et l'optimisation des techniques d'imagerie, il est désormais possible (et couramment utilisé) de pouvoir localiser des protéines et d'étudier l'expression des gènes.

Cependant, la visualisation de l'ADN et plus précisément la visualisation d'une séquence d'ADN spécifique reste, quant à elle, encore un domaine à approfondir. Les principales techniques de marquage de loci génomiques consistent à coupler une protéine fluorescente au répresseur Lac ou Tet [97], aux ZnFingers [98] et TALEs [99], et sont restreintes au marquage de séquences répétées, en plus d'être difficiles à appliquer et chronophages.

Actuellement, le système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated protein 9) est l'une des méthodes les plus utilisées pour visualiser une séquence d'ADN précise. Cette technique, fondée sur la reconnaissance d'une séquence d'ADN spécifique via un ARN guide, permet la modification des génomes par l'induction d'une cassure double brin et activation des systèmes de réparation de l'ADN au niveau d'une séquence spécifique cible de la protéine Cas9. En fusionnant la protéine dead Cas9 à un fluorophore, il est désormais possible d'utiliser le système CRISPR/Cas pour imager des loci génomiques dans des cellules vivantes [100] [101]. Malgré son fort potentiel pour la modification et la visualisation de génomes endogènes, le système CRISPR/Cas9 est dépendant de la présence d'une séquence PAM en amont de l'ARN guide, ce qui ne lui permet pas de cibler n'importe quelle séquence, et peut également induire un fort effet *off target*. De plus, la nécessité de devoir transférer séparément les différents éléments du système entraîne une variation d'efficacité du système selon le modèle considéré [102]. Cette technique a ainsi permis de visualiser en direct des séquences répétées ou des séquences uniques, mais cette visualisation a nécessité la co-transfection de plus d'une vingtaine d'ARN guides.

Bien qu'ayant toutes leurs avantages, ces techniques déjà complexes à mettre en œuvre ont un coût important, et, par le nombre de composants requis, ne pourront pas être utilisées pour des analyses quantitatives, encore moins dans des campagnes de criblage à haut contenu.

Depuis les dernières années, nous avons développé un nouveau système de détection de l'ADN qui permet à la fois la visualisation et la quantification de l'ADN dans des cellules vivantes : la technologie ANCHOR™.

IV.1 Système ANCHOR™ : origine et description

La technologie ANCHOR™ a été développée en 2012 et est dérivée d'un système de partition bactérien permettant la ségrégation de l'ADN bactérien ou plasmidique lors de leur division cellulaire. Plus précisément, le système ANCHOR™ dérive du système de partition bactérien de type I, qui est constitué de 3 éléments :

- *parS*, qui sont des séquences de pseudo ADN centromériques présentes en plusieurs exemplaires dans l'ADN bactérien,
- ParB, qui sont des protéines possédant un domaine de fixation de haute spécificité sur les sites *parS*, un domaine de fixation à ParA et un domaine de liaison aux autres protéines ParB,
- ParA, qui sont des protéines dimériques de types ATPases, et qui sont requises pour la ségrégation des chromosomes et des plasmides.

Lors de la division cellulaire bactérienne, les protéines ParB vont venir se fixer spécifiquement sur les sites *parS* afin de former un complexe nucléoprotéique, appelé complexe de partition. Alors que les protéines ParB continuent de se fixer sur ce complexe et sur l'ADN alentour, les protéines ParA, sous leur forme ATP dimérique, vont également venir se lier sur le complexe. Lorsque la concentration en protéines ParB est suffisante (environ 500 protéines) l'activité ATPasique de ParA s'active. Cette activation induit alors l'hydrolyse de l'ATP en ADP et la dépolymérisation du fuseau, entraînant ainsi le déplacement du complexe de partition vers le pôle opposé [103] [104] (Figure 17).

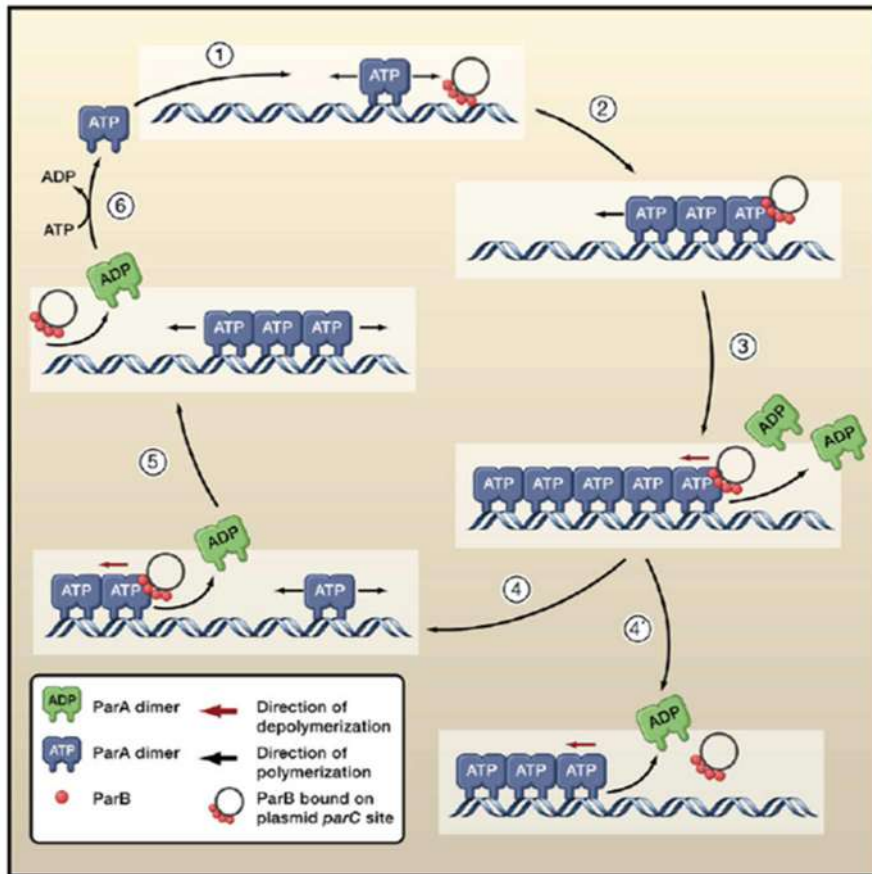


Figure 17. Système ParABS et ségrégation plasmidique.

1. Fixation des protéines ParB sur les séquences centromériques du plasmide (*parS* ou ici *parC*) et formation du complexe de partition. 2. Recrutement des protéines ParA au niveau du complexe de partition. 3. Activation de l'activité ATPasique des protéines ParA et hydrolyse de l'ATP en ADP. 4-5 Dépolymérisation du fuseau et déplacement du complexe de partition [105].

Ainsi, le système ANCHOR™ est un système bipartite constitué de deux éléments (Figure 18) :

- ANCH, qui correspond à une séquence d'ADN non codante et non répétitive, dont la taille varie entre 400 et 1000 nucléotides et qui regroupe plusieurs sites de nucléation correspondant à des séquences *parS*,
- gène OR-FP, correspondant à la fusion du gène de la protéine OR (ParB) et d'un fluorophore, tel que la *green fluorescent protein* (GFP) par exemple.



Figure 18. Système ANCHOR™.

Le système ANCHOR™ se compose d'un gène codant la protéine OR fusionnée à un fluorophore (FP) et de la séquence ANCH contenant plusieurs sites de nucléation pour les protéines OR-FP.

Une fois traduites, les protéines OR-FP vont venir se lier spécifiquement sur les sites de nucléation de la séquence ANCH. Une fois la liaison stabilisée, les protéines OR-FP vont s'étaler sur toute la séquence ANCH, ainsi que sur les séquences d'ADN alentours par un phénomène d'oligomérisation de proche en proche, entraînant ainsi l'accumulation d'environ 500 protéines OR-FP et la formation d'un spot fluorescent facilement détectable par microscopie à fluorescence et correspondant à la localisation de l'ADN (Figure 19).

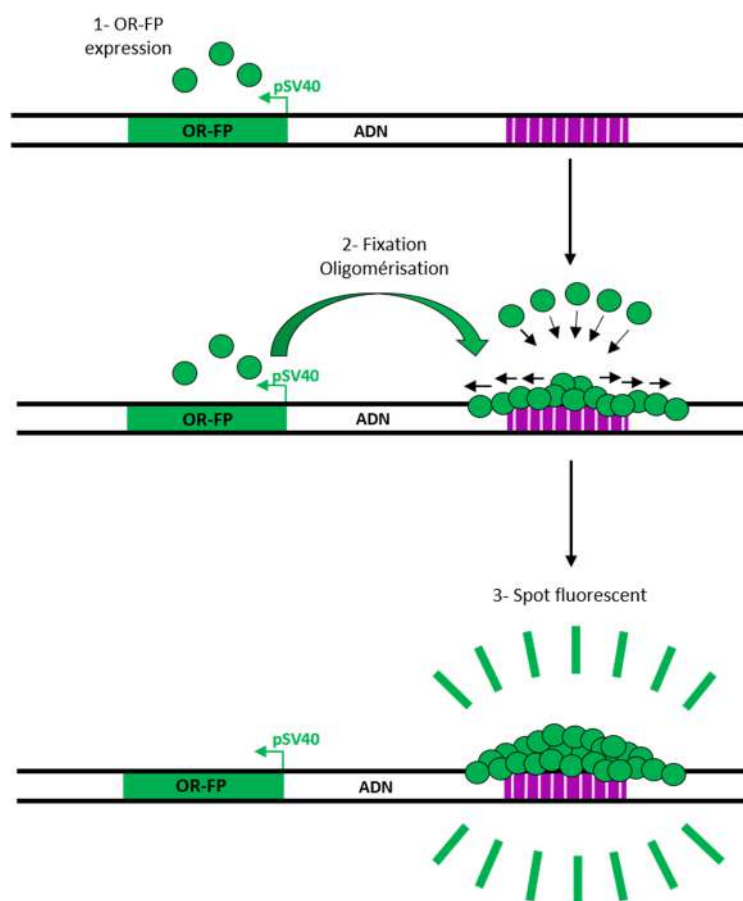


Figure 19. Principe du système ANCHOR™.

Une fois traduites (1), les protéines OR-FP se fixent sur les sites de nucléation de la séquence ANCH (2). Après liaison, les protéines OR-FP s'étalent sur la séquence ANCH et l'ADN alentour (2). L'accumulation des protéines OR-FP entraîne la formation d'un spot fluorescent (3).

IV.2 Technologie ANCHOR™ appliquée à la virologie

D'abord utilisée pour étudier les phénomènes de réparation des cassures double brin chez la levure [106] et la dynamique de la chromatine lors de la transcription [107], la technologie ANCHOR™ a ensuite été appliquée en virologie (Figure 20). Inséré dans le génome du cytomégalovirus humain (hCMV), le système ANCHOR™ a permis pour la première fois de visualiser la totalité du cycle viral du hCMV en temps réel, de l'infection des cellules à leur lyse. Par le suivi de l'ADN, cette technologie a également contribué à étudier les mécanismes de réplication de l'adénovirus humain (hADV5) [108], de décapsidation et des phases précoces de réplication de HIV-1 [109] [110], de mesurer le potentiel oncolytique de différents poxvirus [111] [112] ou de suivre l'infection de baculovirus [113].

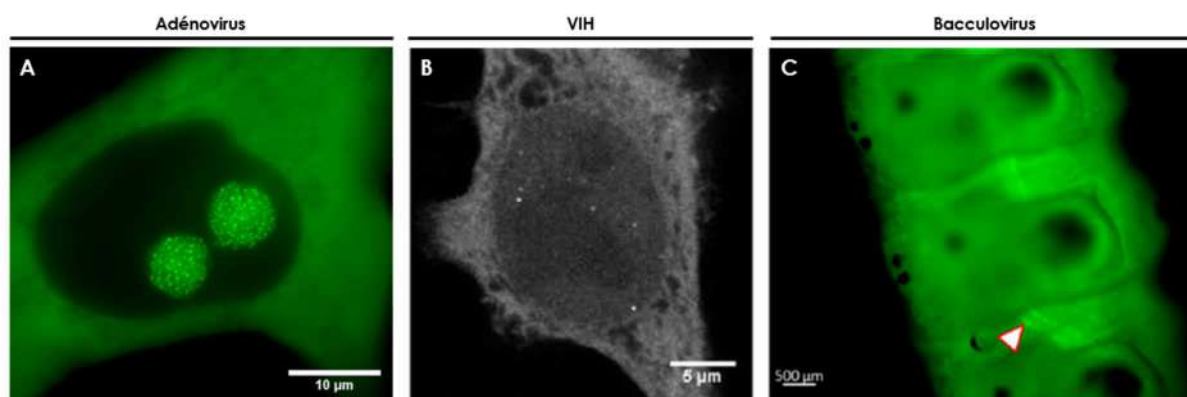


Figure 20. Exemples de virus ANCHOR GFP

A. Centres répliatifs de l'adénovirus humain de type 5 ANCHOR GFP. B. Visualisation de l'ADN rétro-transcrit du virus de l'immunodéficience humaine VIH. Les spots correspondent au génome viral [110]. C. Suivi du baculovirus ANCHOR GFP (flèche) dans l'épithélium trachéal d'une larve infectée [113].

Grâce à la possibilité de suivre en temps réel l'infection et la réplication virale au sein même des cellules, la technologie ANCHOR™ se révèle être un outil très intéressant pour le domaine de la virologie, autant pour les études fondamentales que pour la recherche de nouvelles molécules. De plus, cette technique est facilement combinable avec des outils de haut débit et permet d'obtenir des résultats quantitatifs multiparamétriques et qualitatifs rapides à faible coût, ce qui fait du système ANCHOR™ un véritable atout pour le repositionnement de composés comme antiviraux, tant pour la médecine humaine que vétérinaire.

Cependant, cette technologie a été le plus souvent utilisée pour faire avancer la santé humaine et peu de virus animaux ont été marqués avec ce système. Ainsi, dans cette étude nous avons voulu appliquer la technologie ANCHOR™ à l'une des sous-familles les plus prévalentes dans le monde animal : les *Alphaherpesvirinae*. Affectant un grand nombre d'espèces animales, telles que les félinidés, les canidés, les équidés, les bovidés, les suidés ou encore les delphinidés [114] [115], les alphaherpèsvirus représentent un problème de santé publique majeur pour lesquels les moyens d'études et les traitements sont limités. Comme preuve de concept de son potentiel d'étude et de quantification des alphaherpèsvirus, nous avons choisi d'insérer le système ANCHOR™ dans le génome de l'herpèsvirus équin de type 1 (HVE-1).

V. L'herpèsvirus équin de type 1

Identifié en 1932 grâce aux travaux de Dimock et Edwards sur l'avortement chez la jument [116], l'herpèsvirus équin de type 1 fut d'abord nommé *equine abortion virus* en conséquence des avortements qu'il induisait. Les travaux de Manninger dans les années 1940 [117] et de Doll dans les années 1950 amenèrent la preuve que ce virus n'était pas seulement responsable d'avortements, mais qu'il induisait également des pathologies respiratoires [118] [119] [120]. L'herpèsvirus équin sera alors renommé *equine viral rhinopneumonitis* [121], et ce n'est qu'en 1963 et l'observation en microscopie électronique que Plumer et Waterson mettront en lumière l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae* [122].

V.1 Un virus au sein d'une grande famille

Les *Herpesviridae* sont une famille de virus appartenant à un ordre plus grand, appelé *Herpesvirales*, intégrant tous les virus de type herpès. La famille des *Herpesviridae* regroupe ainsi l'ensemble des virus affectant les mammifères, les oiseaux et les reptiles, et est divisée en trois sous-familles : *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae* ; chacune d'entre elle regroupant plusieurs genres de virus. L'herpèsvirus équin de type 1 fait ainsi partie de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, et plus précisément du genre *Varicellovirus* (Figure 21) [123].

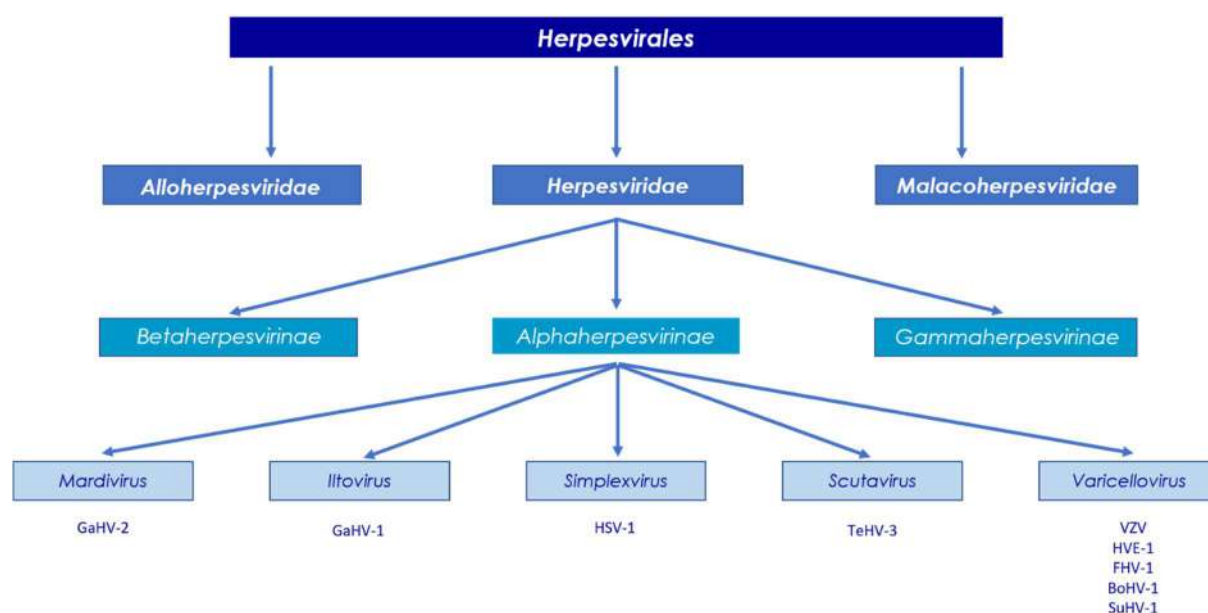


Figure 21. Classification simplifiée des herpèsvirus, de l'ordre *Herpesvirales* à HVE-1.

GaHV: gallid herpèsvirus. HSV: virus herpès simplex de type 1. TeHV-3: testudinid herpèsvirus de type 3. VZV: virus de la varicelle. HVE-1 : herpèsvirus équin de type 1. FHV-1 : herpèsvirus félin de type 1. BoHV-1 : herpèsvirus bovin de type 1. SuHV-1 : herpèsvirus porcin de type 1. Seuls quelques virus sont cités pour exemple. La liste complète des virus appartenant à chaque genre est disponible sur : <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Représentation adaptée de Davidson et al. [123].

Indépendamment de leur famille d'origine, tous les herpèsvirus partagent 4 propriétés biologiques communes [124]:

- avoir un nombre d'enzymes important pour le métabolisme des acides nucléiques, la synthèse d'ADN et la modification des protéines,
- utiliser le noyau des cellules hôtes pour la réplication et l'assemblage des nouvelles particules,
- induire un cycle lytique,
- entraîner une phase de latence chez l'hôte.

Cependant, malgré ces caractéristiques communes, les 3 sous familles d'herpèsvirus possèdent leurs propres propriétés. Les alphaherpèsvirus se caractérisent par un cycle de réplication court, une dissémination rapide en culture cellulaire, un large spectre d'hôtes, et une latence dans les neurones et les ganglions sensoriels ; tandis que les betaherpèsvirus ont un cycle de réplication long, une progression lente en modèle cellulaire avec un spectre d'hôte limité, et une latence dans les globules blancs et les leucocytes. Enfin, les gammaherpèsvirus sont réputés pour leur

infection de cellules lymphoblastoïdes, leur spectre d'hôtes très restreint, et leur latence dans les tissus lymphoïdes [124].

V.2 Structure et organisation génomique de HVE-1

Les particules d'HVE-1 mesurent environ 200 nm de diamètre et renferment une molécule d'ADN double brin linéaire protégée par 3 structures différentes : la capside, le tégument et l'enveloppe [125] (Figure 22).

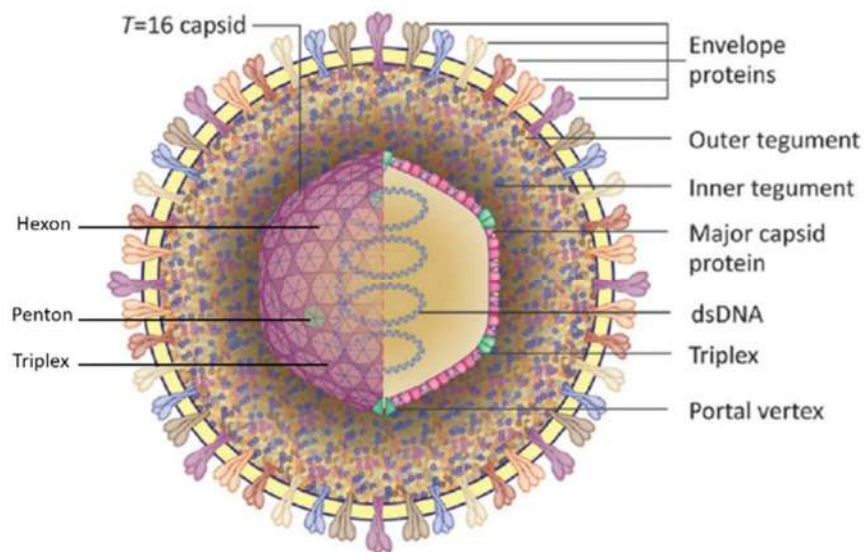


Figure 22. Structure d'une particule d'HVE-1.

Le génome d'HVE-1 est constitué d'une molécule d'ADN double brin (dsDNA) protégée par une capside icosaédrique organisée en hexones et pentones et qui est constituée de trois protéines majeures (*major capsid protein*, *triplex protein* et *portal vertex*). Autour de la capside se trouve une matrice protéique appelée tégument et qui est elle-même recouverte par une enveloppe lipidique dans laquelle sont incorporées des glycoprotéines. Modifié à partir de Payne et al, 2017 [126].

V.2.1 Organisation du génome

Le génome d'HVE-1 est constitué d'une molécule d'ADN double brin linéaire d'environ 150 kb de long, et regroupe 80 cadres ouverts de lectures (ORFs) qui codent pour 76 protéines (les gènes ORF64, 65, 66 et 67 étant dupliqués) [127] (Figure 23).

Ainsi, le génome de HVE-1 est organisé selon une architecture précise, dite de type D, et est divisé en 6 parties [124] [128] :

- Séquences répétées terminales aux extrémités du génome (TR_L et TR_S),
- Séquence longue unique (U_L), située entre la séquence TR_L et IR_L, et regroupant la majorité des ORFs,
- Séquence courte unique (U_S), entre IR_S et TR_S,
- Séquence répétées internes (IR_L et IR_S).

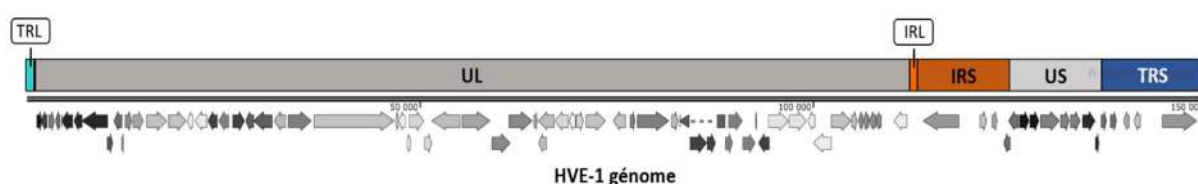


Figure 23. Organisation génomique d'HVE-1.

Le génome d'HVE-1 est divisé en 6 parties composées de 80 gènes au total. TRL : séquence terminale longue répétée. UL : séquence longue unique contenant 63 gènes. IRL : séquence interne répétée longue. US : séquence courte unique. TRS : séquence terminale courte répétée. Les gènes sont représentés par les flèches dont l'orientation définit le sens de transcription. Schéma réalisé selon Telford et al. 1992 [127].

V.2.2 Capside

Comme pour l'ensemble des herpèsvirus, la capsid e d'HVE-1 a une forme icosaédrique et est constituée de 162 capsomères, regroupant 150 hexons et 12 pentons, dont la dénomination provient de la quantité de *major capsid protéin* (MCP) qu'ils contiennent, et dont la liaison est assurée par les protéines triplex. La capsid e a pour but de protéger le génome viral, et possède ainsi à sa base un vortex, constitué de 12 protéines, pour permettre le passage de l'ADN à l'intérieur de la capsid e lors de l'assemblage des nouvelles particules [129] [130] (Figure 22).

V.2.3 Tégument

Le tégument est une structure protéique, située entre la nucléocapsid e et l'enveloppe des herpèsvirus, qui est constituée d'au moins 12 protéines [131] et qui joue un rôle dans le transport via les microtubules, la régulation des gènes et la sortie des nouvelles particules virales [132] [133].

V.2.4 Enveloppe

L'enveloppe est la structure la plus externe des herpèsvirus. Acquis lors de la sortie des nouvelles particules virales, l'enveloppe virale d'HVE-1 est constituée d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont insérées douze glycoprotéines, dont onze sont conservées parmi les alphaherpèsvirus, et qui jouent un rôle dans l'attachement, l'entrée et la dissémination des particules virales. Le rôle de la douzième glycoprotéine, nommée gp2, n'a pas encore été déterminé à ce jour [134].

V.3 Cycle de réplication d'HVE-1

Comme pour la plupart des virus, le cycle de réplication de l'herpèsvirus équin de type 1 peut être divisé en plusieurs étapes : attachement des particules virales à la cellule hôte, entrée à l'intérieur de la cellule, transport de la capsid jusqu'au pore nucléaire, transcription des gènes et réplication du génome viral, puis enfin assemblage et dissémination des nouvelles particules (Figure 24).

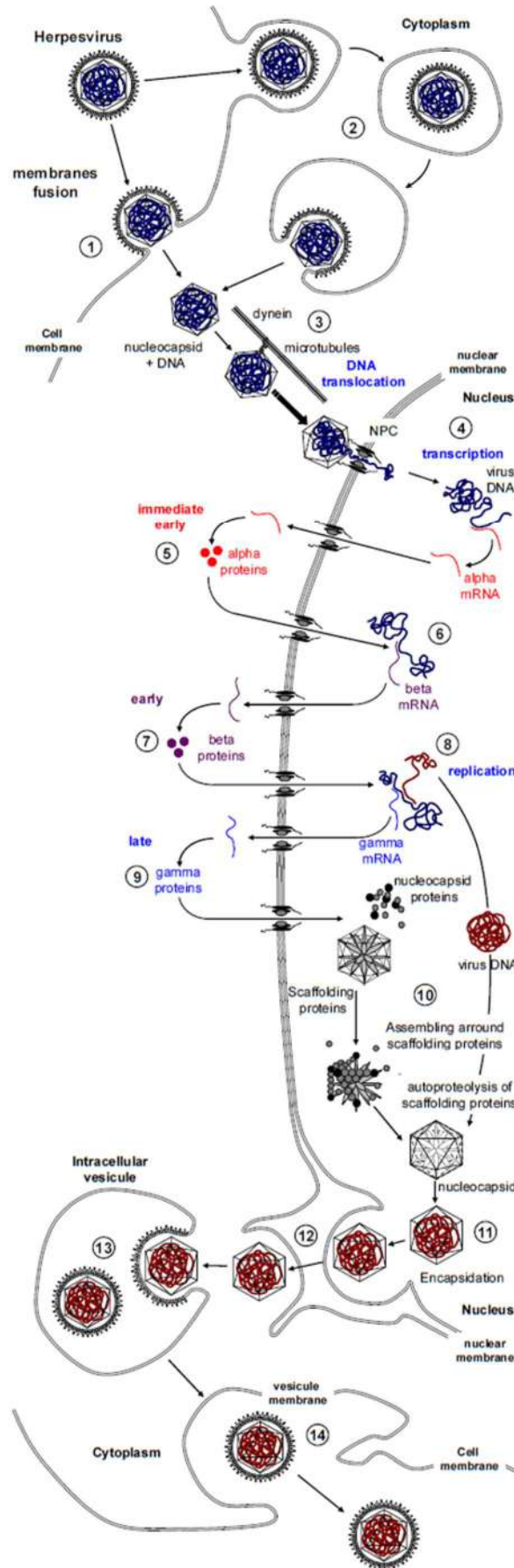


Figure 24. Cycle de HVE-1.

1. Entrée des particules virales par fusion ou par endocytose (**2**). **3.** Transport de la nucléocapside jusqu'au noyau par le réseau de microtubules. **4.** Transcription des gènes très précoces (α -mRNA). **5.** Traduction des protéines virales très précoces (α proteins). **6.** Transcription des gènes précoces (β mRNA). **7.** Traduction des protéines précoces (β proteins). **8.** Réplication de l'ADN viral et transcription des gènes tardifs (γ mRNA). **9.** Traduction des protéines tardives (γ proteins). **10.** Assemblage de la nucléocapside. **11.** Encapsidation de l'ADN viral. **12.** Premier enveloppement et sortie du noyau. **13.** Second enveloppement. **14.** Fusion avec la membrane plasmique et sortie des nouvelles particules virales [134].

V.3.1 Attachement des particules sur la cellule cible

L'attachement des particules sur la cellule hôte, aussi appelée adsorption, est la première étape du cycle viral d'HVE-1 et représente la liaison instable et réversible entre les glycoprotéines d'enveloppes gC et gB, et les héparanes sulfates présentes à la surface des cellules cibles [135]. Une fois les particules fixées, la liaison entre gB et les héparanes sulfates peut également entraîner un phénomène de glissement, appelé « surfing » afin de permettre au virus de trouver les récepteurs nécessaires à l'entrée dans la cellule [136].

V.3.2 Entrée des particules dans la cellule

La première étape à l'entrée consiste à la liaison de la glycoprotéine gD avec un de ses récepteurs. De nombreuses études ont démontré que la protéine gD de HVE-1 pouvait se lier sur un grand nombre de récepteurs, dont HVeA HVeB, HVeC qui sont également utilisés par HSV-1 [137], le CMH-I [138] [139] et les intégrines $\alpha\beta 5$ et $\alpha\beta 3$ [140], ce qui lui permet ainsi de pouvoir infecter un grand nombre de cellules telles que les cellules équines, , bovines, porcines, humaines ou de lapin [141] [142], et d'avoir un large spectre d'hôte allant du cheval à l'ours [143], en passant par le lapin [144], le hamster [145] et les antilopes [146].

Une fois cette liaison établie, une cascade de signalisation faisant intervenir les protéines RhoGTPases, et notamment ROCK-1, est activée afin de préparer la membrane cellulaire à l'entrée des particules virales [147]. Simultanément, la fixation de gD sur son récepteur envoie un signal au complexe de glycoprotéines virales gH/gL.

Le complexe gH/gL se fixe alors sur ses co-récepteurs, principalement des intégrines, ce qui induit respectivement soit la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique cellulaire [148], soit l'endocytose de la particule virale et la fusion de l'enveloppe avec la membrane de l'endosome [140]. La fixation du complexe sur son récepteur induit également l'activation de la glycoprotéine virale gB qui assure alors l'étape de fusion de l'enveloppe avec les composants cellulaires [140] [149] (Figure 25).

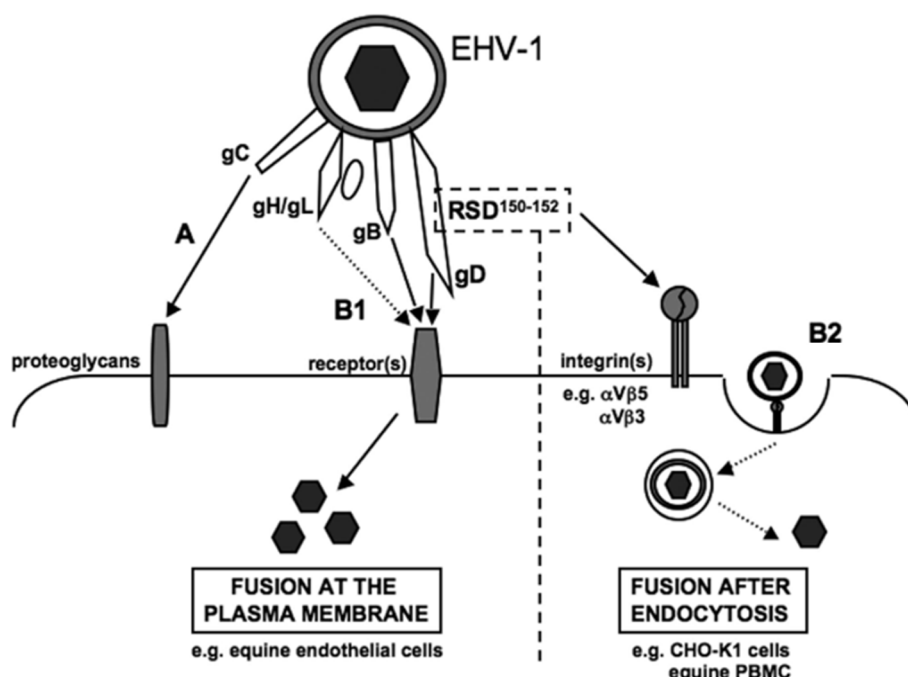


Figure 25. Attachement et entrée des particules d'HVE-1.

A. : attachement des particules via l'interaction entre gC et les héparanes sulfates (proteoglycans). B1 : mécanisme de fusion. L'interaction de gB avec son récepteur induit la liaison du complexe gH/gL sur son propre co-récepteur, ce qui a pour effet d'activer la glycoprotéine gB et le déclenchement de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique. La nucléocapside est ainsi directement délivrée dans le cytoplasme. B2 : mécanisme d'endocytose. L'interaction de gD puis de gH/gL induit l'endocytose des particules virales. La fusion entre l'enveloppe et la membrane de l'endosome se fait ensuite selon le même principe que pour B1 [140] .

L'entrée des particules virales est un mécanisme complexe dont la voie d'entrée dépend de plusieurs paramètres et dont une version simplifiée est présentée dans ce manuscrit. Concernant HVE-1, il a été démontré que celui-ci utilise préférentiellement le CMH-1 pour infecter les cellules équines [150], et les autres récepteurs pour les cellules non équines, notamment l'intégrines $\alpha V\beta 5$ pour entrer dans les cellules de hamster (CHO-K1) [140]. L'infection des cellules RK13, ED et des cellules endothéliales équines se ferait principalement par fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane [151] [140], alors que l'endocytose serait le mécanisme privilégié pour l'entrée des particules à l'intérieur des cellules de hamster et des cellules équines mononuclées du sang périphérique (EPBMCs) [140].

V.3.3 Transport jusqu'au pore nucléaire

Une fois libérée dans le cytoplasme, la nucléocapside doit être transportée jusqu'au noyau afin d'amener l'ADN viral jusqu'à son site de réplication. Il a été démontré que les herpèsvirus utilisaient le réseau de microtubules [152] [153], via le transport rétrograde de la dynéine [154] [155], pour amener la nucléocapside jusqu'au pore nucléaire.

Frampton a démontré que HVE-1 avait également besoin d'un réseau de microtubules intact et de l'action de la dynéine pour amener la nucléocapside jusqu'au pore nucléaire, et ce, quel que soit le type cellulaire considéré [156].

Après le transport de la nucléocapside, l'ADN viral doit être importé à l'intérieur du noyau. Les mécanismes mis en place entre le transport d'HVE-1 et la transcription des gènes très précoces ne sont pas encore définis, mais des études ont permis d'amener quelques précisions sur ceux de HSV-1. Ainsi, une fois arrivée au niveau du complexe du pore nucléaire, la capsid d'HSV-1 s'ancrerait aux bords de celui-ci via les filaments présents à sa surface [157] [158], et l'ADN serait ensuite injecté directement à travers le pore nucléaire selon des mécanismes encore inconnus [158].

V.3.4 Transcription des gènes et réplication de l'ADN

Comme pour l'ensemble des herpèsvirus, la transcription des gènes d'HVE-1 est réalisée par l'ARN polymérase de type II cellulaire, et s'effectue en plusieurs étapes [159] [160]. A la suite de son activation par la protéine du téguement V16 [161] [162] [163], l'ARN Pol II transcrit tout d'abord les gènes IE, dits très précoces, ou *immediate early*. Leurs protéines respectives sont ensuite traduites dans le cytoplasme et passent ensuite dans le noyau afin d'activer la transcription des gènes précoces E, ou *early*. De la même façon, les protéines E sont traduites dans le cytoplasme et passent ensuite dans le noyau pour activer la machinerie cellulaire nécessaire à la réplication de l'ADN viral. Parallèlement à la réplication de l'ADN, les gènes tardifs L, *late*, sont transcrits pour permettre la production des protéines de la capsid, du téguement et de l'enveloppe.

V.3.5 Assemblage et sortie des particules virales

Chez les herpèsvirus, l'assemblage des nouvelles particules virales a lieu dans le noyau. A la suite de leur synthèse, les protéines de la capsid vont passer dans le noyau et s'associer avec des protéines d'assemblage [164] [165] [166]. L'assemblage des futures capsides s'effectue alors en plusieurs étapes, avec la formation d'intermédiaires non matures appelées pro-capsides [167]. L'ADN viral nouvellement synthétisé sera ensuite encapsidé à l'intérieur de ces pro-capsides, afin d'entraîner la dissociation des protéines d'assemblage et la formation des capsides matures [168].

Une fois formées, les nucléocapsides vont bourgeonner à la surface de la membrane nucléaire interne, lors d'un phénomène appelé premier enveloppement, entraînant ainsi la formation de particules virales enveloppées dans l'espace périnucléaire. Ces particules virales fusionnent ensuite avec la membrane nucléaire externe, ce qui induit la perte de leur enveloppe et la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme : il s'agit de l'étape de dé-enveloppement. Une fois dans le cytoplasme, les nucléocapsides acquièrent de nouvelles protéines du tégument. Ces protéines du tégument vont ensuite interagir avec des vésicules provenant du Trans -Golgi, ce qui induit l'entrée des nucléocapsides à l'intérieur de vésicules intracellulaires. Il s'agit ainsi du deuxième enveloppement par lequel les nucléocapsides acquièrent leur enveloppe lipidique [169] [170]. A l'intérieur des vésicules, les glycoprotéines virales sont insérées dans l'enveloppe des nucléocapsides pour former les particules virales matures. Enfin, la fusion des vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique permettrait l'export des particules virales de la cellule par exocytose et leur libération dans l'espace extracellulaire (Figure 26).

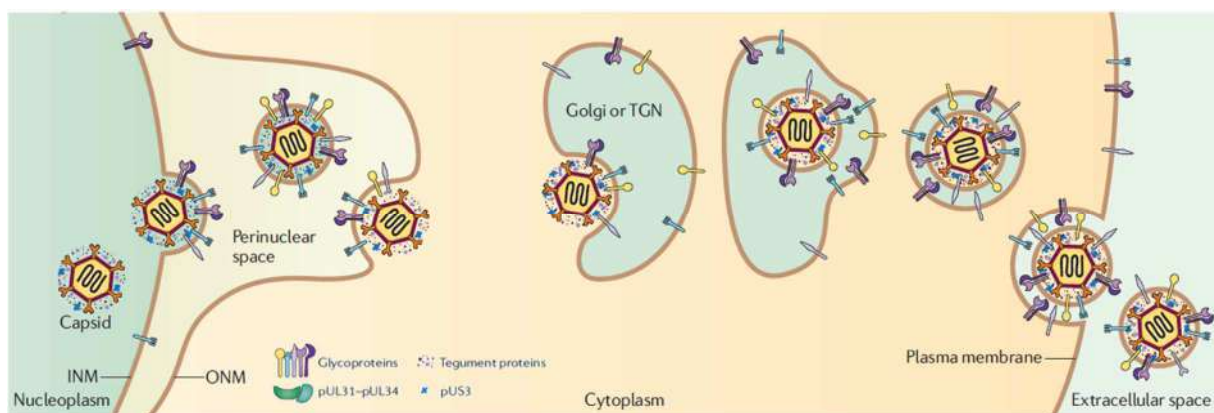


Figure 26. Sortie des nouvelles particules virales selon le modèle d'enveloppement / dé-enveloppement et re-enveloppement.

Les nucléocapsides obtiennent leur première enveloppe lors du bourgeonnement au niveau de la membrane interne du noyau (INM). Cette enveloppe est ensuite perdue lors de la fusion avec la membrane nucléaire externe (ONM) et libération des nucléocapsides dans le cytoplasme. La fusion des nucléocapsides avec des vésicules issues du Trans-Golgi (TGN) leur permet d'acquérir leur enveloppe définitive ainsi que les glycoprotéines virales. Enfin, les vésicules du TGN fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule entraînant la libération des particules virales dans le milieu extracellulaire. Adapté d'après Jonhson et Baines. 2011 [171].

Ces étapes mettent notamment en jeu les protéines virales UL31 et UL34 [172], la kinase codée par US3 [173] [174], ainsi que les glycoprotéines gB,[175], gH [176], gK [177], gD, gE [178] et gM [179] [180].

Ainsi, même si les études sur HVE-1 ne sont pas aussi développées que celles sur HSV-1, il a notamment été démontré par Granzow que les particules d'HVE-1 étaient également libérées selon ce phénomène d'enveloppement / dé-enveloppement / ré-enveloppement [181]. La kinase encodée par US3 et les glycoprotéines gK, gM d'HVE-1 sont également importantes pour la sortie des nouvelles particules virales et auraient un rôle similaire à celles des autres alphaherpèsvirus [182] [183] [184].

La dissémination des particules virales chez les herpèsvirus, y compris chez HVE-1, peut également s'effectuer par la transmission directe du virus d'une cellule infectée à une cellule non infectée, entraînant une dissémination rapide du virus et la formation de cellules géantes, appelées syncytia, et correspondant à la fusion de plusieurs cellules [185] [186] [187].

V.4 Pathogénèse d'HVE-1

L'herpèsvirus équin de type 1 est un virus très prévalent et contagieux chez le cheval, qui peut provoquer rhinopneumonies, avortements, troubles neurologiques et lésions oculaires, selon une pathogénèse en 3 étapes [188] [189] (Figure 27).

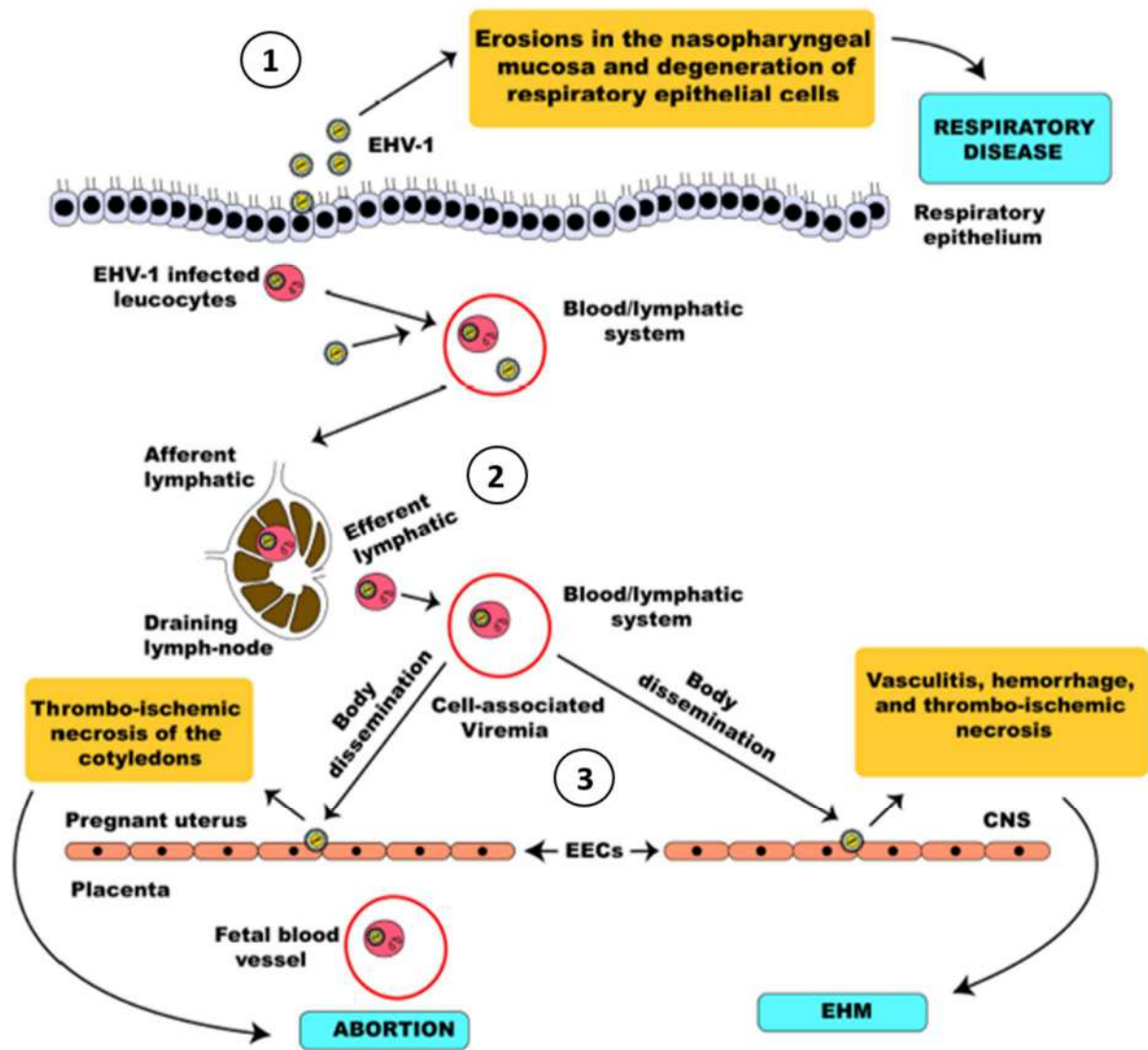


Figure 27. Cycle pathologique d'HVE-1.

1^{ère} étape : infection et répllication dans les cellules épithéliales du système respiratoire, entraînant la nécrose des tissus respiratoires et l'apparition de la rhinopneumonie. 2^{ème} étape : infection des cellules du système immunitaire et passage dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques. 3^{ème} étape : dissémination dans les organes cibles via la circulation sanguine provoquant l'avortement et / ou la myéloencéphalopathie. Modifié d'après Oladunni et al, 2019 [190].

V.4.1 Système respiratoire et rhinopneumonie

La transmission de l'herpèsvirus équin de type 1 se fait principalement par aérosols et contact direct entre animaux [191], ou, dans de cas très rares, par l'eau et la nourriture [192]. Le système respiratoire constitue donc le premier site de répllication d'HVE-1.

Après inhalation, les particules d'HVE-1 infectent rapidement les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur, et plus particulièrement les cellules épithéliales du

nasopharynx [193]. L'action simultanée de la réplication virale et de la réponse inflammatoire cellulaire induit la nécrose des cellules infectées et la dissémination des particules virales, ce qui entraîne l'apparition des signes cliniques, dont le pic est atteint 2 à 5 jours après l'infection, tels que de la fièvre, de la toux, et un écoulement nasal purulent [193] [194] [195]. L'ensemble de ces affections est communément regroupé sous le terme de rhinopneumonie.

V.4.2 Ganglions lymphatiques et virémie

A la suite de leur réplication dans le système respiratoire et de leur excrétion, les particules virales d'HVE-1 vont ensuite traverser la membrane basale des cellules épithéliales respiratoires pour rejoindre la circulation sanguine et les nœuds lymphatiques [196]. Pour cela, il semblerait qu'HVE-1 synthétise des molécules spécifiques pour attirer des cellules du système immunitaire (cellules mononucléées ou *PBMCs*) [197], et notamment les monocytes CD172a+ et les lymphocytes T [198] [199]. Une fois infectés, ces leucocytes peuvent traverser la membrane basale et ainsi retourner dans la circulation sanguine et lymphatique, possiblement par diapédèse après interaction avec les cellules endothéliales. Les lymphocytes infectés vont ainsi pouvoir atteindre les nœuds lymphatiques via les vaisseaux afférents afin de coloniser les ganglions sous-mandibulaires, rétropharyngiens ou bronchiques [189]

Une fois dans les ganglions lymphatiques, HVE-1 va continuer sa propagation via les leucocytes infectés. La réplication d'HVE-1 au sein des ganglions lymphatiques entraîne alors une importante production de cellules mononucléées infectées, telles que les lymphocytes et les monocytes [200] [201] qui seront ensuite disséminées librement dans la circulation sanguine, induisant une virémie pouvant durer jusqu'à 14 jours [201].

V.4.3 Réseau vasculaire : avortement, myéloencéphalopathie et lésions oculaires

La circulation de *PBMCs* infectés permet ainsi à HVE-1 d'atteindre trois organes majeurs du cheval : l'appareil reproducteur, le système nerveux central (SNC) et les yeux. Pour cela, les *PBMCs* infectés vont libérer les particules virales d'HVE-1 dans les cellules endothéliales du tissu considéré par transmission directe de cellule à cellule [202], permettant ainsi à HVE-1 d'échapper au système immunitaire de l'hôte [203].

V.4.3.1 Avortement

Lors d'une épizootie d'HVE-1, l'avortement peut avoir lieu dans 87% des cas lorsqu'une jument gravide est infectée [204], et peut avoir deux origines.

La première résulte de l'apparition d'une vascularite et d'une thrombose ischémique au niveau des micro-cotylédons du placenta, et entraîne une séparation entre le placenta et le fœtus. Le fœtus est alors privé d'oxygène, et ne peut survivre, induisant l'avortement de la jument [205].

La deuxième se produit lors d'atteintes mineures de l'utérus ou du placenta. Dans ce cas, les lésions n'induisent pas de séparation du placenta, mais les dégradations induites par des micro-vascularites permettent le passage des particules d'HVE-1 à travers la barrière placentaire. Le fœtus est alors infecté par HVE-1 de manière quasi-systémique, entraînant l'apparition de macro-lésions dans la plupart des organes et la mort du fœtus. Lorsque l'infection fœtale a lieu dans les derniers mois de la gestation, le fœtus peut être vivant à la mise bas. Cependant, les poulains présentent de sévères troubles respiratoires dès leur naissance et ne survivent que quelques jours [196].

V.4.3.2 Myéloencéphalopathie

Selon un schéma similaire à celui responsable des avortements, le passage des particules d'HVE-1 des *PBMCs* aux cellules endothéliales du système nerveux central entraîne une nécrose des vaisseaux sanguins de l'encéphale et de la moelle épinière, et l'apparition de troubles neurologiques regroupés sous le terme de myéloencéphalopathie (EHM) [206].

Les symptômes apparaissent entre 6 à 10 jours après infection, et se traduisent principalement par une ataxie (trouble de l'équilibre), voire une paraplégie [207]. La prise en charge des animaux atteints d'EHM est très lourde. Par leur impossibilité à se tenir debout, les chevaux doivent être maintenus par des sangles, et des systèmes d'alimentation et d'abreuvement spécifiques doivent être mis en place. Des mesures doivent également être prises pour aider les animaux à uriner et déféquer [208].

Lors d'une épizootie d'HVE-1, l'EHM a une prévalence pouvant être comprise entre 13 et 70%, avec une moyenne d'environ 30% [204] [209] [210].

Cependant, même si une récupération est possible lorsque les symptômes de myéloencéphalopathie sont légers, la récupération de la totalité des capacités physiques est

longue et demande un suivi vétérinaire régulier. Malheureusement, lorsque les symptômes sont plus graves et qu'aucune amélioration ne peut être envisagée, une euthanasie des animaux est nécessaire pour environ 30% des cas [211].

V.4.3.3 Lésions oculaires

Il semblerait également que les particules d'HVE-1 peuvent infecter les vaisseaux sanguins oculaires, induisant alors des lésions chorioretiniennes pouvant entraîner la destruction de la rétine et la cécité [212]. La plupart des lésions oculaires induites par HVE-1 étant le plus souvent subcliniques ou passant inaperçues, peu de données *in vivo* sont disponibles. Cependant, selon une étude expérimentale, 50 à 90% des chevaux infectés par HVE-1 présenteraient des lésions oculaires [213].

V.4.4 Neuropathogénicité et virulence des souches d'HVE-1

Bien que certains facteurs tels que le stress ou l'âge puissent être des stimuli suffisants pour induire une réactivation d'HVE-1, la neuropathogénicité de certaines souches peut avoir une origine génomique.

En effet, il a été démontré que la substitution de l'adénine à la position 2254 (A₂₂₅₄) en guanine (G₂₂₅₄) du gène de la polymérase virale, induisant alors la synthèse d'un acide aspartique à la place d'une asparagine, serait suffisante pour induire des symptômes neurologiques [214] [215] [216]. Ces résultats ont été confirmés par une étude épidémiologique réalisée en Irlande en 2018 démontrant que le génotype G₂₂₅₄ était retrouvé dans environ 86% des souches neurologiques isolées entre 1990 et 2017, tandis que le génotype A₂₂₅₄ est prévalent à 95% dans les souches non neurologiques [217].

D'autres études ont révélé l'implication de certains gènes dans la pathogénèse d'HVE-1, notamment les gènes ORF1, ORF2 et ORF71, dont la délétion induit une diminution des signes cliniques chez le cheval [218] [219] [220]. De plus, une étude comparative menée par Shakya en 2017 a démontré que ces trois gènes étaient absents de la souche atténuée et peu pathogène d'HVE-1 KyA confirmant ainsi le rôle de ces gènes dans la virulence des souches d'HVE-1 [221].

V.4.5 Latence et réactivation

Comme pour l'ensemble des autres herpèsvirus, HVE-1 est capable d'induire une phase de latence, correspondant au maintien du génome d'HVE-1 sous une forme inactive ; lui permettant ainsi de persister chez son hôte sans être détecté par le système immunitaire. Pour la plupart des alphaherpèsvirus, cette phase de latence a lieu au niveau des neurones sensoriels, et plus particulièrement ceux du ganglion trigéminé [222] [223] [224].

Durant la phase de latence, l'expression du génome viral est réprimée sous l'action de plusieurs mécanismes qui sont encore mal connus pour HVE-1. On peut cependant raisonner par analogie avec HSV-1, pour lequel il semblerait que la répression des gènes d'HSV-1 pendant la phase de latence soit le résultat de deux mécanismes.

Le premier serait la séquestration de la protéine du tégument VP16, essentielle pour l'activation des gènes *immediate early*, dans le cytoplasme. Elle ne pourrait donc pas entrer dans le noyau des cellules neuronales, empêchant ainsi la transcription des gènes d'HSV-1 [225] [226].

Le deuxième mécanisme correspondrait à un changement d'état de la chromatine empêchant ainsi la fixation des facteurs de transcriptions sur les promoteurs des gènes viraux. L'ADN viral latent se retrouve alors sous une forme circularisée, appelée épisode [227] [228] [229].

Cependant, la transcription n'est pas totalement arrêtée puisque la présence d'un transcrit, appelé LAT (*latency associate transcript*), a été démontrée dans les neurones trigéminés pour HSV-1 et HVE-1 [230]. Pour HVE-1, ce transcrit est également retrouvé au niveau des PBMCs des ganglions lymphatiques où a lieu la phase de virémie [231]. Le LAT est issu de la transcription d'un gène spécifique uniquement exprimé dans les neurones et permettrait de maintenir en vie les neurones infectés afin de survivre le plus longtemps possible dans l'organisme de l'hôte [232] [233] [234]. Il pourrait également avoir pour rôle d'induire le changement d'état de la chromatine et la répression du génome sous forme épisomale [229].

Même si les gènes d'HVE-1 sont réprimés pendant la phase de latence, leur réactivation peut intervenir à n'importe quel moment, et est le plus souvent dû à certains stimuli. Il a été notamment démontré que le stress, tel que le transport des chevaux, ou des traitements à base de corticoïdes pouvait ainsi entraîner la réactivation du virus [194] [235]. D'autres facteurs de risques tels que la saison, l'âge ou un système immunitaire affaibli pourrait également être à l'origine d'une réactivation d'HVE-1 [208].

Les mécanismes de sortie de la phase de latence sont encore mal définis, notamment en ce qui concerne l'expression de la protéine VP16, pour laquelle plusieurs hypothèses ont été étudiées. La première évoque un mécanisme permettant la transcription de certains gènes précoces et tardifs indépendante de l'expression des gènes très précoces et donc de VP16. L'expression de ces gènes induirait alors une synthèse *de novo* de protéines VP16, qui pourraient ainsi permettre de transcrire les gènes très précoces et de reprendre un cycle lytique [236]. La seconde suppose que le stimulus nécessaire à la réactivation serait le point de départ d'une voie de signalisation permettant l'entrée de la protéine VP16 à l'intérieur du noyau des cellules neuronales via son interaction avec un facteur cellulaire [237] [238]. Une fois dans le noyau, la protéine VP16 peut alors initier la transcription des gènes très précoces comme lors de la phase lytique (Figure 28).

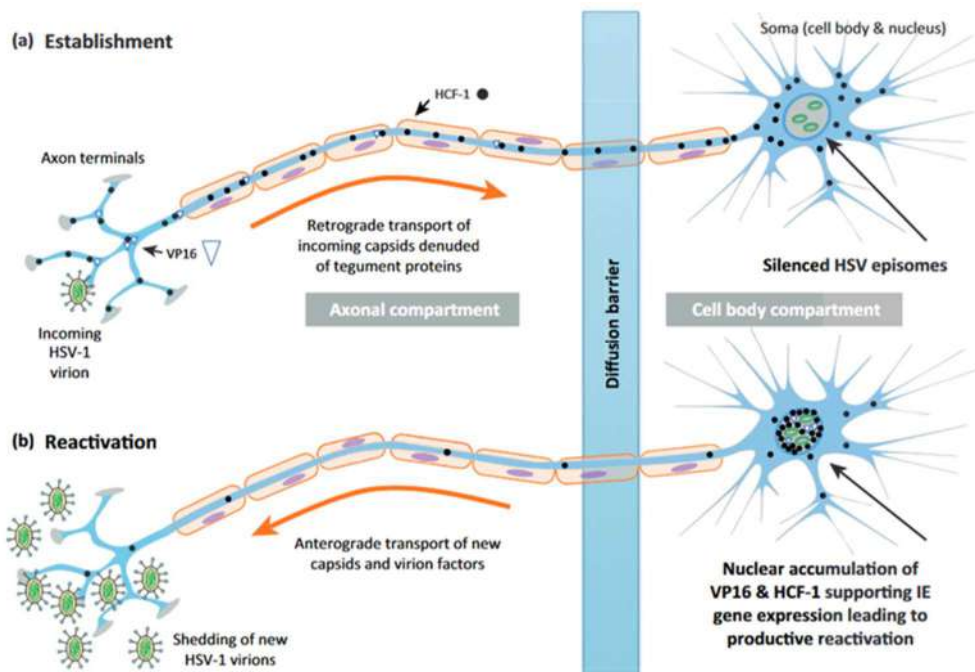


Figure 28. Latence et réactivation.

- L'absence de transport de la protéine VP16 le long de l'axone entraîne la rétention de la protéine VP16 dans le cytoplasme de la cellule empêchant ainsi l'initiation de la transcription des gènes très précoces d'HSV-1. La phase de latence est enclenchée et le génome d'HSV-1 persiste dans le noyau des cellules hôtes sous une forme inactive appelée épisome.
- Lors de la réactivation, l'import et l'accumulation de la protéine VP16 et du facteur cellulaire HCF-1 dans le noyau des cellules neuronales à la suite d'un stimulus extérieur permet l'initialisation de la transcription des gènes très précoces. Le génome d'HSV-1 est alors réactivé et retrouve sa forme originale afin d'être répliqué. Les nouvelles particules virales sont ensuite libérées vers les sites d'infections afin d'initier un nouveau cycle de pathogénèse [237].

Cependant, pour que les gènes viraux puissent s'exprimer, l'ADN viral doit retrouver une structure propice à la transcription. Les mécanismes de décondensation de l'ADN lors de la réactivation n'ont pas encore été révélées, mais certaines déméthylases pourraient être impliquées [239] [240].

A la suite de la réactivation, les particules virales d'HVE-1 migrent des ganglions trigéminés jusqu'à la muqueuse nasale afin d'initier un nouveau cycle de réplication lytique. L'excrétion des particules virales rend ainsi le cheval contagieux pour ses congénères même si les signes cliniques sont légers ou inexistant.

De plus, l'activation et l'excrétion d'HVE-1 dans les ganglions lymphatiques induit une nouvelle phase de virémie pouvant être à l'origine d'avortements et de myéloencéphalopathies.

V.5 Impact économique d'HVE-1

Par sa très forte contagiosité, l'herpèsvirus équin de type 1 est un virus dont la propagation est très rapide, et dont les épizooties peuvent grandement impacter la filière équine mondiale.

Une étude rétrospective sur une épizootie d'HVE-1 dans le Finistère en 2012 a permis de donner un aperçu sur l'impact financier que pouvait avoir HVE-1 sur une seule structure [241]. Lors de cette épizootie, l'ensemble des 90 chevaux et poneys présents sur le site ont présenté des signes cliniques. Dix-neuf ont déclarés des symptômes neurologiques, dont 8 sont morts ou ont été euthanasiés suite à leur EHM et dont 3 ont succombé à une surinfection bactérienne.

Au total, cette épizootie aura coûté 184 000 € au centre équestre. Ces dépenses comprennent les frais vétérinaires et d'analyses, d'équarrissage, la perte financière sèche due au décès de certains animaux, les coûts nécessaires aux équipements de protection individuel et de désinfection, l'achat de nouveaux chevaux et les pertes sèches consécutives à la mise en quarantaine de la structure [241] (Tableau 5). Cependant, ce centre a pu bénéficier d'une forte réduction des frais vétérinaires, et d'une aide du Réseau d'Epidémiologie-Surveillance des Pathologies Equines (RESPE) et du laboratoire Labéo de Frank Duncombe. L'impact économique présenté dans cette étude, bien que très important, est minoré et les frais réels sont donc plus importants.

	Débit	Crédit
Frais vétérinaires	3 100 €	Aide du vétérinaire, frais minorés
Frais d'analyse	400 €	Aide du RESPE et du laboratoire Frank Duncombe
Perte de chevaux dressés	45 000 €	
Achat de 8 chevaux	36 800 €	60% frais de « succession »
Aide pour l'achat d'un neuvième cheval		23 000 €
Petite pharmacie	1 200 €	Environ 50% offerts
Matériel de protection (combinaisons, gants, charlotte, ...)	500 €	Environ 50% offerts
Matériel d'écuries pour les zones de quarantaine	900 €	
Manque à gagner dû à la fermeture de la structure	70 000 €	
Construction d'une infirmerie	20 000 €	
Prêt pour la construction de l'infirmerie		20 000 €
Equipement de la future infirmerie	6 000 €	
Auto-financement		141 000 €
Total	184 000 €	184 000 €

Tableau 5. Impact économique d'un foyer d'HVE-1.

Modifié d'après Gauthier, 2014 [241].

Au niveau national, la France a connu une importante flambée des cas d'HVE-1 en 2018, avec 43 foyers d'HVE-1 (77 chevaux, dont 6 cas d'EHM parmi lesquels 5 décès) déclarés au cours du premier semestre, dont 39 entre mars et juin, ayant ainsi entraîné la fermeture de nombreux centres et pensions, et l'annulation de plus de 600 concours [242] [243].

Le RESPE et l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE) ont établi une note détaillant l'impact économique de cette épizootie au niveau national, prenant en compte les frais vétérinaires et les pertes économiques des 39 structures déclarées entre mars et juin, mais également l'impact économique pour les organisateurs de concours suite à l'annulation des concours, ainsi que les coûts sanitaires nécessaires mis en place pour accéder aux concours non

annulés. Au total, cette épizootie d'HVE-1 aura coûté un peu plus de 5 millions d'euros à la filière équine (Tableau 6) [242].

Acteurs touchés	Montants des pertes (estimation)
Centres équestres, pensions, élevages, ...	940 000 à 1 880 000 €
Compétiteurs (visite vétérinaire de bonne santé)	1 100 000 €
Organisateurs de concours	2 400 000 €
Total	4 400 000 à 5 400 000 €

Tableau 6. Impact économique de l'épizootie d'HVE-1 en France entre mars et juin 2018.

Modifié d'après Jourdain et al, 2019 [242].

A ce montant financier doivent être rajoutées les pertes économiques locales dues à l'annulation des concours et correspondant au chiffre d'affaires que les concours auraient rapporté au département. Cependant, comme ce montant est propre à chaque département, il ne peut pas être additionné au niveau national. Une exemple a été calculé pour le Calvados, pour lequel l'annulation de deux concours majeurs (CSO amateur / pro de Deauville et jumping amateur / pro de Cabourg) a entraîné un manque à gagner d'environ 805 000 € pour le département [242].

En plus de leur impact sur le côté affectif et psychologique des propriétaires vis-à-vis de leurs animaux, les épizooties à HVE-1 ont un impact économique très important pour le monde du cheval, et concernent toutes les structures, qu'il s'agisse de chevaux de sport, d'élevages ou de centres équestres, mais également les organisateurs de concours et les localités.

Par conséquent, il est important de développer des méthodes de prévention efficaces pour limiter l'apparition de foyers HVE-1, protéger les animaux et éviter la mise à l'arrêt de toute la filière équine.

V.6 Mesures de prévention des épizooties

Pour prévenir les épizooties d'HVE-1, 3 catégories de mesures sont mises en place : des bonnes pratiques générales à appliquer quotidiennement, des mesures sanitaires renforcées à mettre en place lors d'épizootie afin de limiter sa propagation, et enfin la vaccination (Figure 29).

En France, une association a été créée en 1999 afin de faciliter la surveillance des pathologies équines et de mettre en place des réponses rapides en cas d'épizooties : le réseau d'épidémiologie-surveillance des pathologies équines (RESPE). Pour cela, le RESPE regroupe des professionnels de tous les domaines du cheval et notamment un ensemble de plus de 800 vétérinaires sentinelles, dont le rôle principal est de détecter rapidement les maladies infectieuses et de les faire remonter au RESPE afin d'alerter toute la filière équine (<https://respe.net/>). Le RESPE organise également des conférences régulières sur les bonnes pratiques générales et les mesures sanitaires à appliquer pour limiter les épizooties (Figure 29).

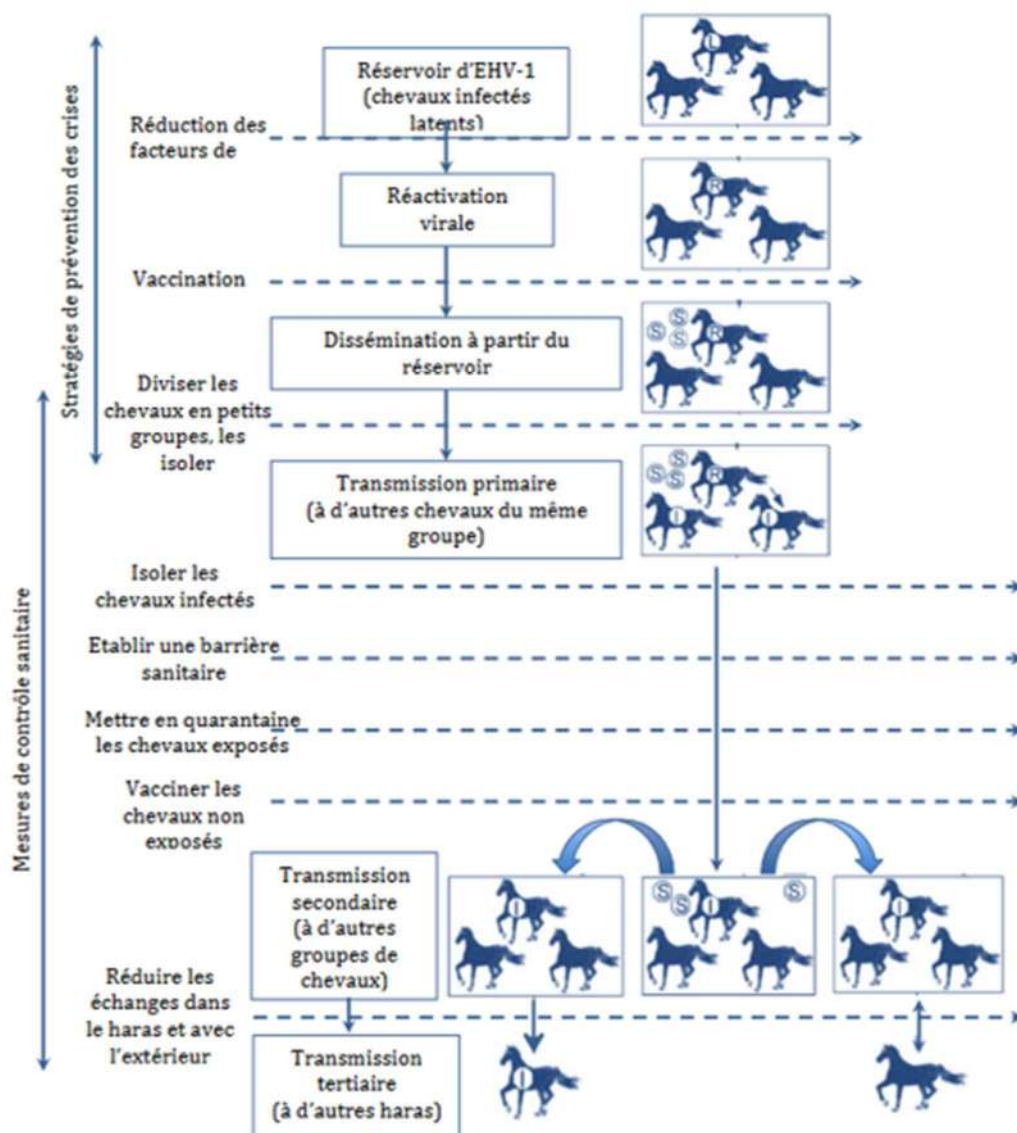


Figure 29. Mesures de prévention et de contrôle des épizooties d'EHV-1.

Chaque ligne horizontale représente une mesure de prévention permettant de limiter la réactivation d'EHV-1 ou de limiter la propagation des épizooties. Les lignes verticales correspondent à la propagation des épizooties lorsque les mesures ne sont pas appliquées. L : latence. R : réactivation. S : dissémination. I : infection [241].

V.6.1 Bonnes pratiques générales

La réactivation d'HVE-1 étant principalement liée à l'état de stress des animaux, la meilleure façon de prévenir de nouvelles épizooties est donc de réduire les sources de stress, même si il est difficilement envisageable de réduire le transport des chevaux dans le cadre de compétitions.

Pour limiter l'expansion des épizooties, il serait ainsi préférable de constituer des groupes de chevaux comptant peu d'individus et d'isoler chaque nouvel arrivant, ou chaque cheval revenant de concours, pendant 21 jours afin d'éviter toute contamination [195]. Cependant, la mise à l'isolement des nouveaux arrivants est rarement mise en place au sein des centres équestres ou des pensions de propriétaires, ce qui peut alors constituer le point de départ d'une nouvelle épizootie.

V.6.2 Mesures sanitaires pour le contrôle des épizooties

En plus des mesures de prévention quotidiennes, des mesures sanitaires spécifiques doivent être mises en place lorsqu'un cas d'HVE-1 est déclaré au sein d'une structure équestre. Afin de limiter l'épizootie, le cheval positif et ceux avec lesquels il a été en contact doivent être directement mis en quarantaine dans un pré ou un box isolé des autres chevaux, celui-ci devant être suffisamment éloigné afin d'éviter toute transmission par aérosol. Des mesures de désinfections doivent également être appliquées, notamment par la mise en place d'un pédiluve à l'entrée de la zone de quarantaine. Le personnel soignant doit également s'équiper de protections à usage unique. Si cela n'est pas possible, les soigneurs devront être en mesure de changer de vêtements après chaque passage en zone de quarantaine [195] [244].

Cependant, la mise en place de ces mesures sanitaires n'est pas toujours suffisante pour éviter la propagation d'HVE-1, et ce même au sein de cliniques vétérinaires [187] [245]. Il est donc nécessaire de coupler ces mesures avec d'autres moyens de prévention, et notamment avec la vaccination.

V.6.3 Vaccination

Le premier vaccin anti HVE-1 a été développé dans les années 1940 à partir d'organes de fœtus infectés et fut utilisé pendant une dizaine d'années aux Etats-Unis, et plus précisément dans le Kentucky. Cependant, même si ce vaccin permettait une protection contre l'avortement, son utilisation fut abandonnée à cause de ses importants effets secondaires [246].

A partir des années 1970, d'autres vaccins anti HVE-1 ont été développés et sont classés en deux catégories : les vaccins dits inertes et les vaccins dit vivants (Tableau 7).

Vaccin	Producteur	Type	Protection
Duvaxyn EHV-1,4	Zoetis (<i>Etats-Unis</i>)	Inactivé	Rhinopneumonie Avortement
Equiffia	Merial (Europe)	Inactivé	Rhinopneumonie
Equigard	Boehringer Ingelheim (Etats-Unis)	Inactivé	Rhinopneumonie
Equivac EHV-1,4	Zoetis (<i>Etats-Unis</i>)	Inactivé	Rhinopneumonie
Fluvac EHV-4,1 plus	Zoetis (<i>Etats-Unis</i>)	Inactivé	Rhinopneumonie
Pneumabort K + 1B	Zoetis (<i>Etats-Unis</i>)	Inactivé	Rhinopneumonie Avortement
Prestige	Intervet (Etats-Unis)	Inactivé	Rhinopneumonie
Prestige II	Intervet (Etats-Unis)	Inactivé	Rhinopneumonie
Prestige V	Intervet (Etats-Unis)	Inactivé	Rhinopneumonie
Equigard-Flu	Boehringer Ingelheim (Etats-Unis)	Inactivé	Rhinopneumonie
Double-E FT EHV	Fort-Dodge (Etats-Unis)	Inactivé	Rhinopneumonie
Prodigy	Intervet (Etats-Unis)	Inactivé	Avortement
Resequin	Intervet (Europe)	Inactivé	Rhinopneumonie
Resequin Plus	Intervet (Europe)	Inactivé	Rhinopneumonie
Rhinomune	Pfizer (Etats-Unis)	Vivant atténué	Rhinopneumonie
Rhino-Flu	Pfizer (Etats-Unis)	Vivant atténué et inactivé	Rhinopneumonie

Tableau 7. Vaccins disponibles ou ayant été utilisés pour lutter contre HVE-1.

Mis à jour à partir de Allen, 2002 [195]

V.6.3.1 Vaccins inertes

Les vaccins inertes sont des préparations dans lesquelles le virus n'est plus actif ou n'est pas présent dans sa forme entière. Ainsi ces vaccins sont considérés plus sûrs puisque le virus ne peut plus se répliquer.

Cinq types de vaccins inertes ont été développés pour prévenir les épizooties d'HVE-1 [196] :

- Vaccins inactivés correspondant à l'injection de particules entières d'HVE-1 rendues inactives par traitement chimique et induisant à la fois une bonne réponse immunitaire, une diminution des signes cliniques, et une durée de virémie réduite [247]. Par leur sécurité et leur bonne stimulation du système immunitaire, les vaccins inactivés sont les seuls vaccins inertes à avoir obtenus une autorisation de mise sur le marché, et sont les plus utilisés à l'heure actuelle (Tableau 7).
- Vaccins sous-unitaires constitués d'un ou de plusieurs antigènes viraux et induisant une bonne protection contre les symptômes respiratoires [248].
- Vaccins associés à un complexe immunostimulant, correspondant à la combinaison entre un antigène ou une protéine virale et une matrice augmentant l'immunogénicité de la préparation. Ces vaccins induisent donc une forte réponse humorale permettant de réduire les signes cliniques et la propagation d'HVE-1 mais n'ont pas d'effet sur la virémie [249] [250].
- Vaccins ADN consistant à l'injection d'un fragment d'ADN permettant l'expression directe de l'antigène par l'hôte et la mise en place de la réponse immunitaire. Cependant, cette technique a obtenu des résultats contradictoires selon les études et doit donc être approfondie [251] [252].
- L-particules, correspondant à l'injection de pseudo-particules virales non infectieuses constituées uniquement de l'enveloppe virale et du tégument. L'utilisation de cette technique chez des poulains a montré des résultats mitigés, entraînant une bonne réponse immunitaire mais une faible diminution des signes cliniques [253].

V.6.3.2 Vaccins vivants

Comme leur nom l'indique, les vaccins vivants sont constitués de particules virales actives, et correspondent le plus souvent à l'injection d'une souche virale dont la virulence a été atténuée après de multiples passages en culture cellulaire. Ces vaccins miment ainsi une infection virale et ont démontré une protection contre les signes cliniques de la rhinopneumonie et de l'avortement, ainsi qu'une réduction de la virémie [254].

En revanche, par leur fort potentiel de réversion, ce type de vaccin n'est que peu utilisé pour la prévention des épizooties d'HVE-1 [255] (Tableau 7).

V.6.3.3 La vaccination est-elle vraiment efficace ?

Cependant, même si la vaccination contre HVE-1 existe et protège contre la rhinopneumonie, elle ne permet pas de protéger les chevaux des atteintes neurologiques et induit seulement une protection partielle concernant les avortements. De ce fait, des épizooties régulières d'HVE-1 se déclarent parmi des populations de chevaux vaccinés [256] [257]. Ce fut notamment le cas pour l'épizootie de 2012 décrite précédemment, qui a entraîné la contamination de 90 chevaux et la mort de 11 d'entre eux, dont la protection vaccinale était à jour et renouvelée tous les 4 mois [241], ou comme l'Europe le connaît en ce moment même avec l'épizootie déclenchée lors du concours de saut international de Valence.

De plus, la vaccination contre HVE-1 n'est pas obligatoire en France, hormis pour certaines situations, et peu de propriétaires la réalise. Par conséquent, la couverture vaccinale pour la rhinopneumonie est très faible (moins de 30%) [258], et le risque d'émergence de nouveaux foyers d'HVE-1 est très élevé. De plus, sachant que les avortements et les myéloencéphalopathies sont très prévalentes, et que 90% des chevaux présentent une séropositivité pour HVE-1 dès leur 2 ans [195], l'émergence de nouvelles épizooties suite à la réactivation du virus constitue un risque majeur pour la filière équine. Il est donc également nécessaire de développer des moyens thérapeutiques efficaces pour lutter contre HVE-1.

V.7 Traitements

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement spécifique pour les infections à HVE-1. Ainsi seul le potentiel antiviral de molécules développées pour la médecine humaine a été testé *in vitro* et *in vivo* contre HVE-1. Pour cela, deux paramètres sont analysés : la concentration inhibitrice, ou efficace, permettant de réduire de 50% l'infection virale (IC50 ou EC50) et la concentration cytotoxique induisant 50% de mort cellulaire (CC50). Ainsi, plus une molécule antivirale présente une faible IC50 et une forte CC50 plus elle est puissante et intéressante vis-à-vis d'une application chez l'espèce cible.

La plupart des molécules testées sur HVE-1 sont des antiviraux utilisés pour traiter les infections herpétiques chez l'Homme, et aucune d'entre elle n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché vétérinaire. L'ensemble des molécules testées contre HVE-1 vont être décrites dans cette partie. Pour une meilleure visualisation, leur activité antivirale est résumée dans le tableau 8.

Ces molécules peuvent être classées principalement en deux catégories : les analogues nucléosidiques et les analogues nucléotidiques. Comme leur nom l'indique, ces analogues sont des molécules synthétiques qui s'apparentent soit aux nucléosides soit aux nucléotides naturels, et dont l'incorporation dans l'ADN viral empêche sa réplication.

V.7.1 Analogues nucléosidiques

Les analogues nucléosidiques peuvent être de plusieurs types : analogues de l'adénosine, de la guanosine, de la cytidine, de l'inosine, de l'uridine ou thymidine et correspondent à l'association entre une base nucléique et un sucre. Cependant, tels quels, les analogues nucléosidiques ne sont pas actifs, et leur conversion nécessite plusieurs étapes de phosphorylation [259].

Pour cela, la première étape consiste à l'ajout d'un phosphate sur l'analogue nucléosidique et est réalisée par une enzyme virale très conservée entre les herpèsvirus : la thymidine kinase. Ainsi, l'activité antivirale des analogues nucléosidiques ne sera déclenchée que dans les cellules infectées à l'intérieur desquelles la thymidine kinase virale est synthétisée. Suite à cette phosphorylation, deux autres molécules de phosphates seront successivement ajoutées à l'analogue nucléosidique par des kinases cellulaires afin de former des molécules tri-phosphates pouvant alors être incorporées dans l'ADN viral et stopper sa réplication [259]. Par l'arrêt de la réplication, ces molécules sont ainsi caractérisées « terminateur de chaîne » (Figure 30).

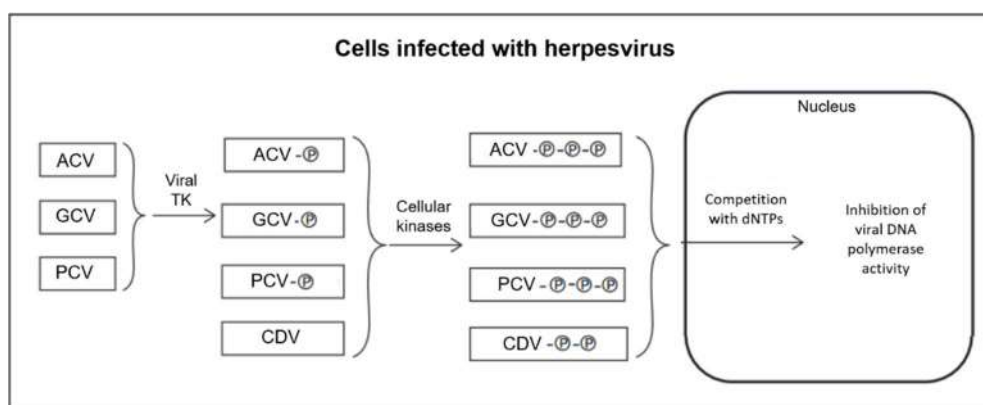


Figure 30. Mécanisme d'action des analogues nucléosidiques et nucléotidiques

Les analogues nucléosidiques sont convertis sous leur forme active en 3 étapes : action de la thymidine kinase virale pour devenir des nucléosides monophosphates puis action de deux enzymes cellulaires pour passer de l'état mono- à l'état di- puis triphosphates. Les analogues nucléotiques (CDV) n'ont pas besoin de la thymidine kinase et leur conversion se fait en deux étapes par les kinases cellulaires. Une fois sous leur forme active, ces molécules antivirales sont incorporées dans le génome du virus, entraînant l'arrêt de la réplication virale. ACV : acyclovir. GCV : ganciclovir. PCV : penciclovir. CDV : cidofovir. Modifié depuis Piret et al, 2016 [260].

La plupart des analogues nucléosidiques utilisés contre HVE-1 peuvent également être retrouvés sous une autre conformation, communément appelée prodrogue, dont les propriétés pharmacocinétiques sont différentes, et qui ont été améliorées afin de favoriser leur adsorption, leur solubilité ou leur perméabilité. Elles possèdent donc une meilleure biodisponibilité. Cependant, sous cette forme, les prodrogues sont peu actives car une action biologique, la plus souvent chimique ou enzymatique, est nécessaire pour permettre la libération du principe actif au niveau d'un site précis.

V.7.1.1 Acyclovir et valacyclovir

L'acyclovir et sa prodrogue valacyclovir sont des analogues de la guanosine et sont couramment utilisées pour traiter les infections herpétiques chez l'Homme [261] [262]. L'acyclovir fut une des premières molécules testées sur l'herpèsvirus équin de type 1 et présente une IC50 contre HVE-1 *in vitro* comprise entre 0,45 et 22 µg/mL (ou entre 2 et 98µM) selon les études, le type cellulaire et la méthode utilisés [263] [264] [265]. Cependant, par sa faible biodisponibilité, notamment orale, l'acyclovir démontre une faible efficacité *in vivo* [266] [267].

En revanche, le valacyclovir démontre une bien meilleure biodisponibilité chez le cheval, permettant ainsi d'atteindre une concentration plasmatique supérieure à l'IC50 définie pour l'acyclovir [64] [268]. Par sa meilleure biodisponibilité, l'activité antivirale du valacyclovir n'a pas été étudiée *in vitro* et a été directement testée *in vivo* chez le cheval. Cependant, les études *in vivo* ont décrit des résultats contradictoires concernant le bénéfice de ce traitement contre HVE-1. En effet, les travaux de Maxwell et al ont démontré que le valacyclovir entraînait une diminution des signes cliniques et de la virémie [269]. Cependant, les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque le traitement a été appliqué un jour avant l'infection et poursuivi pendant deux semaines, démontrant une activité du valacyclovir plus préventive que curative. A

contrario, une étude menée en 2009 sur l'effet du valacyclovir sur des poneys infectés par HVE-1 n'a pas permis d'obtenir une protection des animaux (pas de diminution des signes cliniques et de la virémie) alors que les concentrations plasmatiques d'acyclovir étaient supérieures à celles nécessaires pour atteindre l'IC50 *in vitro* [270].

Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour pouvoir réellement considérer le valacyclovir comme traitement pour les infections à HVE-1.

V.7.1.2 Ganciclovir et valganciclovir

Tout comme l'acyclovir et le valacyclovir, le ganciclovir et le valganciclovir (VAGCV) sont des analogues de la guanosine principalement utilisés pour le traitement de hCMV [261] [271].

De nombreuses études ont démontré le fort potentiel antiviral du ganciclovir contre HVE-1 *in vitro*, avec des IC50 comprises entre 0,033 et 1,9 µg / mL (soit entre 0,13 et 7,44 µM) [264] [265] [272], faisant ainsi du ganciclovir le traitement de référence actuel pour lutter contre les herpèsviroses équines. Cependant, aucune étude *in vivo* n'a été menée pour déterminer si le ganciclovir induisait une protection chez des chevaux infectés par HVE-1. Comme l'acyclovir, le ganciclovir ne possède pas une très bonne biodisponibilité *in vivo*, même si des injections intraveineuses de 2,5mg / kg répétées toutes les 8h pendant 24h puis toutes les 12h ont permis d'obtenir une concentration de ganciclovir plasmatique supérieure à l'IC50 [273] et pourraient donc avoir un effet bénéfique lors d'une infection par HVE-1.

L'action du valganciclovir, prodrogue du ganciclovir n'a que peu été étudiée. Récemment, une étude a permis d'évaluer le potentiel antiviral du valganciclovir *in vitro* avec une IC50 prometteuse de 1,7 µM (soit 0,6 µg/mL) [96]. La même équipe a également étudié l'effet du valganciclovir *in vivo* sur 8 poneys infectés avec une souche française d'HVE-1. Pour cela, un traitement consistant en une prise orale de 6,5mg / kg de valganciclovir 3 fois par jour le premier jour puis deux fois par jour pendant 13 jours a été mis en place pour 4 des 8 poneys infectés, et a permis d'observer une légère diminution du score clinique cumulé et de la virémie, démontrant que le valganciclovir pourrait être utilisé *in vivo* pour le traitement des herpèsviroses à HVE-1 [274]. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de confirmer son activité antivirale *in vivo*.

V.7.1.3 Penciclovir et Famciclovir

Deux autres analogues de la guanosine ont été étudiés sur HVE-1 : le penciclovir, et sa prodrogue famciclovir.

In vitro, le penciclovir a une efficacité similaire à celle de l'acyclovir, avec une IC50 comprise en 1,6 et 4,8 µg/mL (ou entre 6,32 et 19 µM) mais se révèle cependant moins efficace que le ganciclovir [267] [269] [275]. La biodisponibilité du penciclovir n'a pas encore été étudiée chez le cheval à ce jour, et une seule étude *in vivo* a été réalisée chez la souris, démontrant que l'utilisation du penciclovir à une dose quotidienne de 100mg /kg permettait de réduire les signes cliniques et les lésions associées à HVE-1 [275].

Le famciclovir, quant à lui, a démontré un faible effet antiviral *in vitro* avec une IC50 de 24,6 µg/mL (soit 76,5 µM), mais aucune donnée *in vivo* n'est disponible concernant ses capacités à réduire les symptômes d'une infection par HVE-1. Seule une étude de sa biodisponibilité chez le cheval a été réalisée, démontrant qu'une simple prise orale de 20mg / kg de famciclovir permettait d'obtenir une concentration plasmatique de penciclovir supérieure à l'IC50 [276]. Par sa bonne biodisponibilité orale, le famciclovir pourrait être un traitement facile à mettre en place pour traiter les cas d'herpèsvirose à HVE-1, mais d'autres études chez l'animal sont nécessaires pour caractériser son action antivirale.

V.7.1.4 A-5021

L'A-5021 est un analogue de la guanosine efficace contre la plupart des herpès humains [277] [278] [279]. Son activité antivirale contre HVE-1 n'a été étudiée que sur cultures ou explants cellulaires et son IC50 est comprise entre 1,2 et 4,4 µM, démontrant un potentiel antiviral intéressant car supérieur à celui de l'acyclovir, mais dont la biodisponibilité et l'action *in vivo* restent à déterminer [280] [281].

V.7.2 Analogues nucléotidiques

Tout comme les analogue nucléosidiques, les analogues nucléotidiques peuvent être de plusieurs types (adénine, guanine, cytosine, uracile ou thymine) et ne sont pas actifs sous cette forme. Cependant, contrairement aux analogues nucléosidiques, ils possèdent déjà un phosphate à leur extrémité, leur permettant de s'affranchir de la phosphorylation par les kinases

virales. Leur conversion est donc plus rapide et est réalisée par des kinases cellulaires [260] (Figure 30).

V.7.2.1 Adéfovir

L'adéfovir est un analogue de l'adénine qui possède une activité antivirale à large spectre contre l'hépatite B, la plupart des herpèsvirus et contre le VIH [282]. Testé *in vitro* sur HVE-1, l'adéfovir possède une IC50 comprise entre 2,8 et 5,6 µg/mL (10,25 à 20,5 µM) [264], ce qui est bien inférieur au ganciclovir. De plus, aucune étude de biodisponibilité ou d'activité antivirale *in vivo* chez le cheval n'est disponible pour cette molécule. L'adéfovir ne peut donc pas être considéré comme un traitement anti HVE-1 à l'heure actuelle.

V.7.2.2 Cidofovir

Le cidofovir est un analogue nucléotidique dont l'activité antivirale a été démontré pour un grand nombre de virus, dont hCMV, HSV-1, VZV, les adénovirus ou certains poxvirus [283] [284]. Cependant, sa forte toxicité, notamment rénale, a entraîné le retrait de son autorisation de mise sur le marché. Ainsi, l'utilisation du cidofovir chez l'Homme est strictement limitée à des cas d'infections virales graves pour lesquels les traitements ont échoué et requiert une autorisation temporaire d'utilisation nominative.

Le cidofovir démontre une bonne activité antivirale contre HVE-1 *in vitro* avec une IC50 comprise entre 0,01 et 6,7 µg / mL (ou entre 0,03 et 24µM) [194] [265] [264], pouvant ainsi atteindre celles du ganciclovir. Le cidofovir a également démontré une activité antivirale *in vivo* chez des souris et des poulains infectés par HVE-1 suite à une injection sous cutanée de 20 mg / kg [285]. Cependant, par la forte toxicité qu'il induit chez le chat, des études de toxicité chez le cheval devront être effectuées avant de considérer le cidofovir comme traitement anti HVE-1.

V.7.3 Récents développements

Afin d'identifier des molécules antivirales autres que des analogues nucléosidiques et nucléotidiques, de nouvelles études ont été réalisées et ont notamment permis de démontrer l'activité antivirale d'une famille d'histones déméthylases, et plus particulièrement la déméthylase 1 lysine-spécifique (OG-L002), avec une efficacité proche de celle du ganciclovir [286]. Cependant, même si cette protéine a démontré un potentiel très intéressant pour la lutte contre HVE-1 et pourrait constituer un futur traitement, de nombreuses études restent à réaliser afin d'approfondir son activité anti-HVE-1, et de déterminer sa toxicité et sa biodisponibilité.

Molécule	Catégorie	IC50 <i>in vitro</i> (μ M)	Bio- disponibilité	Dose	Protection <i>in vivo</i>
Acyclovir		2-98	Faible	10 mg/kg toutes les douze heures	N.D
Valacyclovir		N.D	Bonne	27 mg/kg toutes les 8h pendant 2 jours, puis 18 mg/kg toutes les 12h Ou 40 mg/kg 3 fois par jour pendant 5 à 7 jours	Résultats contradictoires (diminution des signes cliniques et de la virémie pour le premier traitement / pas de protection pour le deuxième)
Ganciclovir	Analogues nucléosidiques	0,13 - 7,44	Moyenne	2,5 mg/kg toutes les 8h le 1 ^{er} jour, puis toutes les 12h (cheval)	N.D
VAGCV		1,7	Bonne	6,5 mg/kg, 3 doses le 1 ^{er} jour, puis 2 doses par jour pendant 13 jours (cheval)	Réduction signes cliniques et virémie
Penciclovir		6,32-19	Faible	100 mg/kg, Une dose (souris)	Réduction lésions et signes cliniques
Famciclovir		76,5	N.D	N.D	N.D
A-5021		1,2-4,4	N.D	N.D	N.D
Adéfovir		10,2-20,5	N.D	N.D	N.D
Cidofovir	Analogues nucléotidiques	0,03-24	N.D	20 mg/kg, Une dose (souris, poulin)	Réduction signes cliniques et excrétion
OG-L002	Histone déméthylase	N.D	N.D	N.D	N.D

Tableau 8. Activité des molécules antivirales humaines contre HVE-1.

VAGCV : valganciclovir. N.D : non déterminé. Inspiré de Mawell et al, 2017 [263] ; Wong et al, 2010 [267].

V.7.4 Une médecine humaine peu adaptée aux chevaux

Malgré l'étude de nombreux antiviraux à visée humaine, seules quelques molécules semblent réellement utilisables pour une application *in vivo* chez le cheval : le ganciclovir et sa prodrogue valganciclovir, ainsi que le valacyclovir. Cependant, considérant que le poids moyen d'un cheval est de 500 kilos, (entre 950 et 1200 kilos pour les chevaux de trait), le traitement d'une infection à HVE-1 nécessite une grande quantité de molécules et a donc un coût important.

Selon le site *drugs* (<https://www.drugs.com>), le prix pour 500mg de valacyclovir, ganciclovir et valganciclovir est respectivement de 2\$, 7\$ et 60\$ (soit environ 1,6€, 5,8€ ou 49,6€).

Ainsi, en reprenant les protocoles décrits dans le tableau 8 et en les appliquant pendant 15j sur un cheval de 500kg, le coût total du traitement est respectivement de 1 260\$ (1 008€) pour le valacyclovir, 1 400\$ (1 160€) pour le valganciclovir et de 4 650\$ (3 836€) pour le ganciclovir (Tableau 9).

Molécule	Protocole	Dose quotidienne	Dose totale	Prix (1g)	Coût total
Valacyclovir	27 mg/kg, 3x/jour (J1-J2)	J1-J2: 40,5g	315g	3,2 €	1 008 €
	18 mg/kg, 2x/jour (13 jours)	Puis 18g /jour			
Valganciclovir	6,5 mg/kg, 3x/jour (J1)	1 ^{er} jour : 9,75g	100g	11,6 €	1 160 €
	6,5 mg/kg, 2x/jour (14 jours)	Puis 6,5g /jour			
Ganciclovir	2,5 mg/kg, 3x/jour (J1)	1 ^{er} jour : 3,75g	38,75g	99 €	3 836 €
	2,5 mg/kg, 2x/jour (14 jours)	Puis 2,5g /jour			

Tableau 9. Coût total de l'utilisation du valacyclovir, valganciclovir et ganciclovir pour traiter une infection par HVE-1 chez un cheval de 500kg.

Même si la mise en place d'un de ces protocoles pourrait permettre de réduire les symptômes de la maladie, de limiter la propagation d'HVE-1, et de réduire les pertes sèches dues au rétablissement et/ou au décès de certains animaux, il nécessite un grand investissement de la part des centres équestres, des éleveurs et des propriétaires, et il est difficilement envisageable de faire de ces trois molécules un traitement antiviral de référence pour lutter contre HVE-1. Par conséquent, il est nécessaire de poursuivre les recherches afin d'identifier de nouvelles molécules de première classe, dont l'IC50 serait très basse et avec une bonne biodisponibilité afin de réduire les doses et le prix des traitements.

V.7.5 Antiviraux et résistance

Un autre problème majeur des antiviraux décrits précédemment, et que leur utilisation répétée chez l'Homme a entraîné l'apparition de souches virales résistantes aux traitements actuels. Ainsi des souches résistantes à l'acyclovir, ganciclovir et leurs prodrogues respectives sont régulièrement décrites concernant HSV-1, hCMV, et VZV [287] [288] [289] [290].

La principale raison à l'apparition de ces résistants vient du fait que l'ensemble de ces molécules antivirales requière l'action de la thymidine kinase virale pour être actives. Ainsi, des mutations dans le gène de la thymidine kinase ont pu être identifiées dans 95% des souches d'HSV-1 résistantes à l'acyclovir, entraînant ainsi l'absence de production, ou la production d'une thymidine kinase déficiente [291]. Si la thymidine kinase n'est pas synthétisée ou est tronquée, la première étape de phosphorylation nécessaire pour la conversion des analogues nucléosidiques ne peut être réalisée et les molécules antivirales restent sous leur forme inactive [292].

Bien que moins fréquentes, des mutations dans le gène de l'ADN polymérase virale ont également été identifiées, et confèrent également une résistance aux analogues nucléotidiques cidofovir et foscarnet [293] [294] [295].

Par conséquent, les antiviraux utilisés pour traiter les infections herpétiques chez l'Homme nécessitent d'être mieux caractérisés contre HVE-1 *in vivo* et se révèlent souvent inadaptés et onéreux pour une application chez le cheval, notamment par l'importante quantité d'antiviraux nécessaire et la durée du traitement. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches de molécules antivirales contre HVE-1 afin d'élaborer des traitements plus adaptés au cheval, et qui ne requièrent pas l'action de la thymidine kinase afin d'éviter l'apparition de souches résistantes.

Chapitre 2.

Objectifs de la thèse

Afin de proposer un nouveau modèle d'étude des herpèsvirus et de criblage antiviral, le principal objectif de cette thèse était de créer un virus auto-fluorescent par l'insertion de la technologie ANCHOR™ dans le génome d'un alphaherpèsvirus. En effet, par la possibilité de visualiser l'ADN viral, la technologie ANCHOR™ permet de quantifier et d'obtenir simultanément des connaissances fondamentales sur la réplication virale, ce qui n'est pas possible par l'utilisation de virus GFP, dont seule l'expression d'une ou plusieurs protéines est étudiée. Pour que le système puisse facilement être utilisé pour le marquage et l'étude d'autres virus, une stratégie a été mise en place afin de construire un plasmide de transfert optimisé dont les zones d'homologie sont interchangeable. L'utilisation de ce plasmide de transfert a ainsi permis l'insertion du système ANCHOR™ dans le génome de l'herpèsvirus équin de type 1 par recombinaison homologue et la production d'un HVE-1 ANCHORGFP auto-fluorescent, dont l'infection et la réplication virale peuvent être suivies et quantifiées en temps réel dans les cellules vivantes. Le développement et la caractérisation de ce virus recombinant ainsi que sa calibration pour le criblage à haut contenu sont détaillés dans le chapitre 4 : Développement d'un HVE-1 ANCHOR™ pour l'étude et la quantification de l'infection par l'herpèsvirus équin de type 1.

Le second objectif de ces travaux était d'identifier des nouvelles molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin de type 1. Pour cela, la chimiothèque Prestwick Chemical, regroupant 1280 molécules, a été entièrement testée sur l'HVE-1 ANCHORGFP lors d'une campagne de criblage à haut contenu. A la suite de cette campagne, des études de dose réponse et de cytotoxicité ont été menées sur les composés les plus intéressants afin de déterminer les fenêtres thérapeutiques de chaque composé anti-HVE-1. Cette étude a ainsi permis de hiérarchiser les molécules entre elles et de déterminer les plus prometteuses. L'ensemble de ces résultats est décrit dans le chapitre 5 : HVE-1 ANCHORGFP et criblage à haut contenu pour l'identification de molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin de type 1.

Enfin, alors que la construction du plasmide de transfert prenait plus de temps que prévu, retardant ainsi l'obtention du virus recombinant ANCHORGFP et repoussant la campagne de criblage à haut débit, un nouvel objectif a été ajouté à cette thèse : celui de mettre au point un système d'identification de molécules antivirales à faible coût et pouvant être appliqué au criblage à haut contenu en s'affranchissant des systèmes rapporteurs.

Pour cela, nous avons utilisé les applications disponibles sur notre microscope à haut contenu CX7 et mis au point deux quantifications automatisées de l'effet cytopathique, selon le type cellulaire utilisé.

Cette nouvelle méthode de quantification pour le HCS a ensuite été appliquée, et une étude comparative a été réalisée sur la campagne de criblage HVE-1 ANCHORGFP / Prestwick afin de mesurer l'efficacité de cette quantification automatisée de l'effet cytopathique pour la découverte de molécules antivirales.

La description des algorithmes de quantification des effets cytopathiques et les résultats de l'étude comparative sont présentés dans le chapitre 6 : Quantification automatisée de l'effet cytopathique pour une identification rapide de molécules antivirales.

Chapitre 3.

Matériel et méthodes

Le matériel et les protocoles décrits dans cette partie sont communs à l'ensemble du projet et ont été utilisés tout au long des travaux. Les réactifs et protocoles mis en place pour la construction du plasmide de transfert et l'obtention du virus recombinant ANCHOR™ seront décrits dans le chapitre correspondant (chapitre 4), tout comme le protocole de criblage à haut débit et les algorithmes de quantification (chapitres 5 et 6).

I. Lignées cellulaires

Trois lignées cellulaires ont été utilisées dans ce projet : des cellules rénales de lapin RK13 (ATCC CCL-37), des cellules épithéliales dermiques de cheval ED (NBL-6 ATCC CCL57) et des cellules HeLa (ATCC CCL-2). Les lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Sigma) enrichi par 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Eurobio), 1% de pénicilline-streptomycine (Sigma), 1% de glutamine (Sigma) et 1% de sodium pyruvate (Sigma), et maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Par leur grande permissivité à HVE-1, leur croissance cellulaire rapide et leur fort potentiel de transfection, les RK13 constituent un modèle cellulaire de choix pour l'étude et le développement de virus recombinants et ont donc été privilégiées tout au long de ces travaux.

II. Herpèsvirus équin

II.1 Souche virale

La souche d'HVE-1 utilisée dans cette étude a été gentiment fournie par le Dr Aymeric Hans de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) et a été isolée en 2008 sur des tissus pulmonaires de fœtus avorté.

II.2 Production, purification et titration

HVE-1 a été produit et amplifié sur cellules RK13. Lorsque l'effet cytopathique a atteint 100%, le surnageant a été récupéré et centrifugé à 2500 rpm pendant 10 min afin d'éliminer les débris cellulaires. Une deuxième centrifugation sur gradient de sucrose 20% a ensuite été réalisée à 17 500 rpm (42 437 x g) pendant 1h30 à 10°C afin de concentrer les particules virales. Le culot a ensuite été resuspendu avec du milieu de culture puis aliquoté avant d'être stocké à -80°C.

Le titre viral d'HVE-1 a été déterminé par la méthode des dilutions limites (exprimé en TCID₅₀/mL). Pour cela, des cellules RK13 ont étéensemencées en plaque 96 puits (8000 cellules / puits) et incubées à 37°C et 5% CO₂. Le lendemain, les cellules ont été infectées avec 10µL de dilutions virales allant de 10⁻¹ à 10⁻¹⁰ en 8 réplicats et ont été observées quotidiennement pour suivre l'effet cytopathique. Le titre viral a ensuite été obtenu par le calcul statistique de Reed et Muench et a été évalué à 10^{7.5} TCID₅₀/mL [296].

III. Extraction et quantification de l'ADN viral par qPCR

L'ADN d'HVE-1 a été extrait en utilisant le kit d'extraction One-4-all genomic DNA miniprep kit (BioBasic) selon les recommandations du fabricant.

Pour l'amplification de l'ADN viral, les amorces précédemment décrites par Diallo et al en 2006 et permettant l'obtention d'un fragment de 63bp du gène gB ont été utilisées [297] (Tableau 10). Le marquage de l'ADN viral a été réalisé en utilisant le supermix universel iTaq SYBERGREEN (Bio-rad) et la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un thermocycler Light Cycler 480 (Roche). La qPCR a été effectuée selon les conditions suivantes : pré-incubation à 95°C pendant 3 minutes ; suivie par 45 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes et d'une étape d'hybridation et extension à 56°C pendant 45 secondes.

Amorces	Séquence 5'→3'	Mélange réactionnel	Programme
Sens	CATGTCAACGCACTCCCA	<ul style="list-style-type: none"> • 5µL iTaq supermix • 0,15µM amorces • 2µL d'ADN • qsp 10µL H₂O 	Pré-incubation : 95°C 3min
Anti-sens	GGGTCGGGCGTTTCTGT		Dénaturation : 95°C 15s
			Hybridation / élongation : 56°C 45s

Tableau 10. Amorces et programme utilisés pour la quantification de l'ADN d'HVE-1 par qPCR.

qsp : quantité d'eau à ajouter pour atteindre le volume final de 10µL

Pour la quantification de l'ADN, un plasmide contenant le gène gB d'HVE-1 a été construit à l'aide du StrataClone PCR Cloning kit (Agilent Technologies) et a permis de réaliser une gamme étalon, utilisée dans toutes les expériences de qPCR.

IV. Chimiothèque Prestwick Chemical

Pour l'identification de nouvelles molécules antivirales, la chimiothèque Prestwick Chemical a été testée dans son intégralité. La Prestwick est une banque de composés regroupant 1280 molécules, toutes approuvées par l'agence américaine des produits médicamenteux et alimentaires (FDA) et l'Agence Européenne du Médicament (EMA) pour une utilisation chez l'Homme. Au sein de cette banque, les molécules sont réparties aléatoirement en 16 plaques 96 puits contenant chacune 80 composés (Figure 31). Toutes les molécules sont diluées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration finale de 10mM.

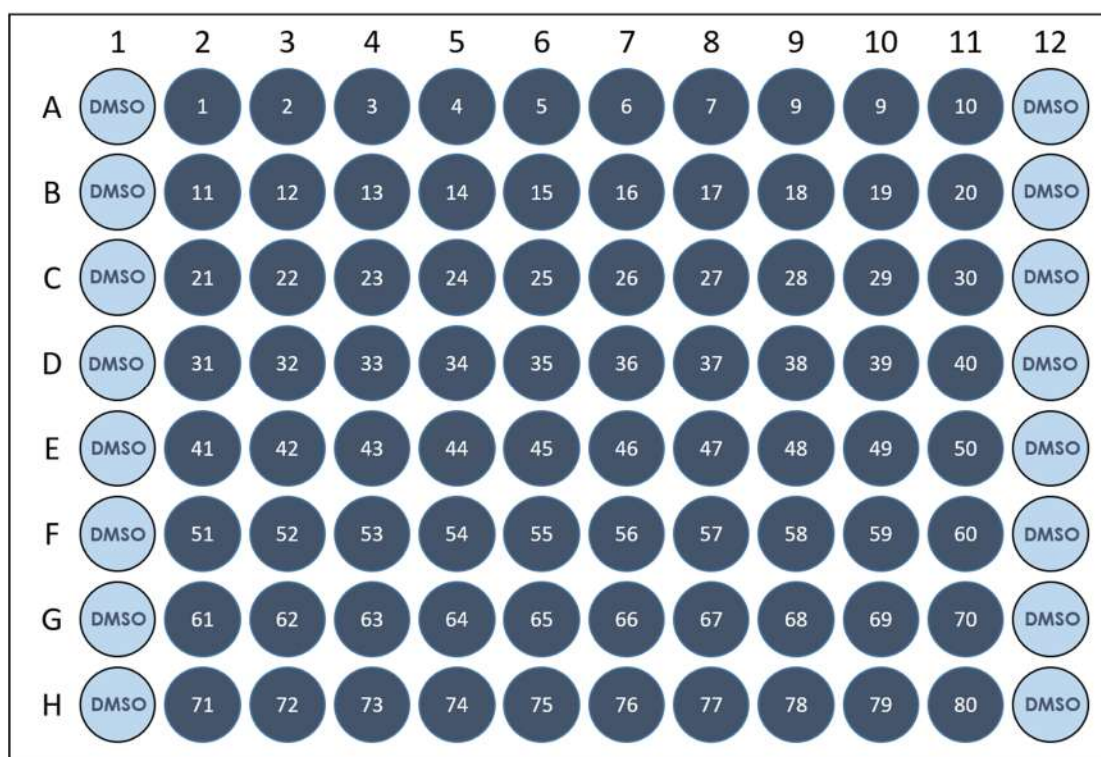


Figure 31. Schéma d'une plaque de la Prestwick.

Chaque plaque de la Prestwick contient 80 composés (cercles gris bleu) répartis dans les colonnes 2 à 11. Les colonnes 1 et 12 contiennent du diméthylsulfoxyde (DMSO) et correspondent aux conditions contrôles (cercles bleu clair).

Pour ce projet, deux banques filles ont été préparées à partir de la banque mère :

- Une banque fille avec des composés à 4mM obtenue par dilution de 20 μ L de Prestwick 10mM dans 30 μ L de DMSO,
- Une banque de travail avec des composés à 0,4mM, obtenue suite à la dilution au 1/10^è de la banque fille à 4mM.

V. Microscopie

V.1 Microscopie à fluorescence et traitement d'images

Les expériences de transfection, le suivi de la recombinaison homologue et du cycle répliatif d'HVE-1 en temps réel ont été réalisés à l'aide du microscope à épifluorescence Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2 et le post-traitement des images a été réalisé avec le logiciel ImageJ.

V.2 Microscopie à haut contenu

La quantification de l'HVE-1 ANCHORGFP et de l'effet cytopathique a été réalisée à l'aide du microscope à haut contenu CellInsight 7 (Cx7) de ThermoScientific.

VI. Statistiques

Les statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7, soit à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicat, soit à partir des triplicats d'une seule expérience. Des statistiques avec une p-value < 0.05 ont été considérées comme significatives. Les tests utilisés sont précisés sous les figures correspondantes.

Chapitre 4.

Développement d'un HVE-1 ANCHOR™ pour l'étude et la quantification de l'infection par l'herpèsvirus équin de type 1

I. Préambule

Depuis plusieurs années, d'importantes connaissances sur les herpèsvirus ont été acquises grâce au développement de chromosomes artificiels bactériens (BACs), correspondant au clonage d'un fragment d'ADN d'intérêt contenant une origine de réplication bactérienne à l'intérieur d'un génome viral. De cette façon, l'ADN viral peut ainsi être amplifié dans les bactéries et facilement manipulé. Grâce à leur grande stabilité et leur capacité à intégrer de longs fragments d'ADN, les BACs ont été principalement utilisés pour cloner de grands génomes comme ceux de HSV-1, VZV, ou FHV-1 [298] [299] [300]. Ces chromosomes bactériens sont également très utilisés pour identifier des gènes [301] et pour déterminer leur fonction *in vitro* et *in vivo* par des études de mutagenèse [302]. Les BACs peuvent aussi être combinés avec des protéines fluorescentes telles que la GFP (BAC-FP) afin de générer des virus recombinants et de marquer une protéine virale spécifique [303]. Ainsi, les BACs-FP permettent de suivre la localisation d'une protéine d'intérêt durant le cycle d'infection. Cependant, ces BACs-FP ne permettent pas de visualiser l'ADN viral, et la réplication virale ne peut donc pas être suivie en temps réel. Des BACs ont été précédemment développés pour l'herpèsvirus équin de type 1, mais ces constructions impliquent le plus souvent l'insertion du fragment au sein même d'un cadre de lecture et, afin de reproduire une infection la plus proche possible de celle de la souche parentale, l'utilisation d'un HVE-1 recombinant pleine taille était préférable.

Dans ce projet, nous avons donc développé une stratégie de clonage permettant d'insérer le système ANCHOR™ dans le génome de l'herpèsvirus équin de type 1* et d'obtenir ainsi un outil dont le nombre de molécules d'ADN, miroir de la réplication virale, peut être directement

* Cette partie fait l'objet d'un article publié dans Journal of Virological Methods et intitulé « ANCHOR-tagged Equine Herpesvirus 1: a new tool for monitoring viral infection and discovering new antiviral compounds ». <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114194>

quantifié et dont l'utilisation devrait permettre d'identifier à la fois des molécules ciblant les étapes nécessaires à l'infection virale, mais aussi des inhibiteurs stricts de la réplication.

II. Matériel et Méthodes

II.1 Matériel

II.1.1 Plasmides

Quatre plasmides ont été utilisés pour le développement du plasmide de transfert pUC19 HVE1ANCHORGFP :

- pEX-A128 E.GPT, synthétisé par Eurofins genomics et contenant la séquence du gène de la xanthine-guanine phosphoribosyltransferase d'*Escherichia.coli* (E.GPT) ainsi que les sites de restriction nécessaires aux différentes étapes de clonage (SwaI, NotI, BglII, BamHI, KasI, AsiSI et PacI)
- pcDNA5FRT, permettant d'obtenir la séquence du promoteur pCMV
- pGEM7SV40ANCHORGFP, développé par NeoVirTech et contenant la séquence ANCH pleine taille (931 nt) et le gène codant les protéines fluorescentes ORGFP sous l'expression du promoteur constitutif SV40
- pUC19, constituant la base de la construction du pUC19 HVE1ANCHORGFP

II.1.2 Oligonucléotides et programmes PCR

Les oligonucléotides utilisés dans ce projet ont été synthétisés par Eurogentec et sont détaillés dans le tableau 11. Les amorces utilisées pour amplifier les zones d'homologie d'HVE-1 ont été désignées à partir de la séquence du génome complet d'HVE-1 disponible sous le numéro d'accès GenBank NC_001491.2.

Les réactions de PCRs ont été réalisées dans un volume final de 50µL contenant :

- 25µL de PrimeStar Max premix 2x (Takara Bio)
- 0,5 µL d'amorce sens et 0,5µL d'amorce anti-sens à 10µM (concentration finale de 0,2 µM)
- 4 ng de plasmide ou 3µL d'ADN d'HVE-1 dilué au 1/10^{ème}
- H₂O distillée pour arriver à un volume final de 50µL

Les PCRs ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler) et les programmes ont été adaptés selon les couples d'amorces et la taille de l'amplicon (tableau 11).

Amorces (taille)	Séquence 5' → 3'	Programme
E.GPT (626 nt)		98°C 1min
Sens	GGAATT CATATG ATTAAATGCGGCCGAGATCT	98°C 10s
Anti-sens	GGAATT AAGCTT TAATTAAGCGATCGCGGCGC	59°C 5s
		72°C 70s } x 30 cycles
ANCHORGFP (4004 nt)		98°C 1min
Sens	GGAATT GGCGCCT CAGCCGTTAAGTGTCCT	98°C 10s
Anti-sens	GGAATT GCGATCGC CTGGCCTTTGCTCACATGT	53°C 5s
		72°C 70s } x 30 cycles
ORF13 HVE-1 (2694 nt)		98°C 1min
Sens	GGAATT ATTAAATTAATTA AGCGATACGGAATCGGGT	98°C 10s
Anti-sens	GGAATT GCGGCCGCT GTCTCCGAGTGTTAATCTT	51°C 5s
		72°C 15s } x 30 cycles
ORF14 HVE-1 (2422 nt)		98°C 1min
Sens	GGAATT GCGATCGC CCTAATGCTGTTACGTCCG	98°C 10s
Anti-sens	GGAATT TAATTA AAGGGTAGGTAGTAGGTGGG	55°C 5s
		72°C 15s } x 30 cycles

Tableau 11. Amorces et programmes PCRs utilisés pour le clonage du plasmide de transfert.

Les séquences en italiques correspondent à des nucléotides ajoutés pour améliorer l'hybridation des amorces. Les séquences en couleur représentent les sites de restriction ajoutés lors de l'amplification. Bleu : site NdeI. Vert : site HindIII. Marron : site KasI. Orange : site AsiSI. Rose : site SmaI. Violet : site PaeI. Jaune : site NotI.

Après amplification, les produits PCRs ont été purifiés avec le kit Gel and PCR Clean-UP de Macherey-Nagel selon les recommandations du fabricant.

II.1.3 Enzymes de restriction

Toutes les enzymes de restrictions utilisées proviennent de New England Biolabs (NEB) et ont été utilisées dans les tampons recommandés et selon les conditions préconisées par le fabricant.

II.2 Méthodes

II.2.1 Clonage

II.2.1.1 Transformation de bactéries

Pour l'amplification des plasmides, des bactéries *Escherichia.coli* (*E.coli*) de souche DH5- α rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium ont été utilisées. Pour la transformation, 100 ng d'ADN plasmidique ont été ajoutés à 50 μ L de bactéries et le mélange a été incubé dans de la glace pendant 30 minutes. Un choc thermique de 40 secondes à 42°C a ensuite été réalisé avant de re-incuber le mélange dans de la glace pendant 5 minutes. Après incubation, 250 μ L d'un milieu enrichi en glucose (SOC) sont ajoutés et la suspension bactérienne est placée sous agitation à 37°C pendant 1h afin de permettre l'expression du gène de résistance contenu dans les plasmides. 100 μ L de cette suspension sont ensuite étalés sur milieu lysogeny broth (LB) gélosé contenant 100 μ g/mL d'ampicilline et incubés une nuit à 37°C.

Concernant l'amplification des clones obtenus après ligation, 4,5 μ L de mélange réactionnel ont été ajoutés à 50 μ L de bactéries et la transformation a été réalisée selon le même protocole.

Le lendemain, les colonies, correspondant aux bactéries transformées par le plasmide et devenues résistantes à l'ampicilline, ont été repiquées et cultivées dans 2mL de milieu LB liquide additionné d'ampicilline pendant 16h à 37°C sous agitation.

II.2.1.2 Purification des plasmides

Après culture liquide, l'ADN plasmidique a été purifié à l'aide du kit High Purity Plasmid Miniprep Kit (NeoBiotech) selon le protocole recommandé par le fabricant.

II.2.1.3 Digestions enzymatiques

Différentes digestions enzymatiques ont été réalisées sur les vecteurs d'expression et les produits PCRs pour la construction du plasmide de transfert pUC19 HVE1ANCHORGFP. Les tampons, enzymes et températures utilisées pour l'ensemble des digestions sont regroupés dans le tableau 12.

Plasmide digéré (fragment cloné)	Enzymes	Protocole	Mélange réactionnel
pUC19 (insertion de E.GPT)	NdeI /HindIII	Incubation HindIII 1h à 37°C puis ajout de NdeI et incubation 1h à 37°C (tampon 2.1)	
pUC19 E.GPT pcDNA5FRT (insertion du promoteur CMV)	BglII/ BamHI	Incubation des deux enzymes 2h30 à 37°C (tampon 3.1)	
pUC19 pCMV E.GPT (insertion du système ANCHOR™)	KasI / AsiSI	Incubation des deux enzymes pendant 2h30 à 37°C (tampon CutSmart)	2µg de plasmide ou de fragment PCR
pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP (insertion de ORF14 HVE-1)	AsiSI / PacI	Incubation de AsiSI pendant 2h30 à 37°C, puis inactivation 20min à 80°C, ajout de PacI et incubation 2h30 à 37°C puis inactivation 20min à 65°C (tampon CutSmart)	1µL d'enzyme(s) (10 unités) 5µL de tampon
pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 (insertion de ORF13 HVE-1)	SwaI / NotI	Incubation de SwaI pendant 1h à 25°C, puis ajout de NotI et incubation pendant 1h à 37°C (tampon 3.1)	qsp 50µL d'H ₂ O

Tableau 12. Enzymes de restriction et protocoles de digestions utilisés lors des différentes étapes de construction du plasmide de transfert.

Après digestion, les plasmides et produits PCRs digérés ont été purifiés avec le kit Gel and PCR Clean-UP de Macherey-Nagel selon le protocole préconisé par le fabricant.

II.2.1.4 Electrophorèses

Les produits PCRs et les digestions enzymatiques ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans un tampon de Tris-acétate EDTA (TAE) 1x. Les échantillons ont été chargés avec du tampon 6x DNA (Takara) et leur taille a été déterminée à l'aide du marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas). Les migrations ont été réalisées à 100 Volts pendant 30 minutes et la révélation de l'ADN a été effectuée sous ultraviolets après coloration dans un bain de SyberGreen (Thermofischer) ou de Gelgreen (EmbiTec) pendant 20 minutes.

II.2.1.5 Déphosphorylations

Lorsque nécessaires, les déphosphorylations ont été réalisées avec la phosphatase alcaline *Shrimp* (Promega) et le tampon associé. Pour cela, 5,1 µL de tampon et 0,5µL de phosphatase ont été ajoutés à 50µL de mélange réactionnel. Le mélange a ensuite été incubé 45 minutes à 37°C avant d'être inactivé à 65°C pendant 20 minutes.

II.2.1.6 Ligations

Pour terminer le clonage, les ligations ont été réalisées avec la T4 DNA Ligase (NEB) (ratios moléculaires insert/vecteur : 1/1 et 3/1) et été incubées à 16°C pendant une nuit.

II.2.1.7 Transfections

L'expression du système ANCHOR™ dans les plasmides pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP et pUC19 HVE1ANCHORGFP a été contrôlée par transfection. Pour cela, des cellules HeLa ont étéensemencées dans des boîtes de culture de 35mm à fond en verre (Ibidi) et transfectées avec un mélange réactionnel contenant 200µL d'OPTI-MEM, 1µg d'ADN plasmidique et 3µL de réactif de transfection Xtreme-gene HP (Roche) (ratio 3 :1 volume de Xtreme-gene / masse d'ADN). La fluorescence a été observée avec le vidéomicroscope Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2.

II.2.2 Recombinaison homologue

Pour obtenir un virus recombinant, des cellules RK13 ont étéensemencées en plaque 96 puits (Corning Cell Bind Black Bottom; Sigma) à une densité de 8 000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules ont été infectées avec différentes concentrations d'HVE-1 WT (2000, 200, 20 ou 2 particules infectieuses) et incubées pendant 4h à 37°C avec 5% de CO₂. Après

incubation, le plasmide de transfert pUC19 HVE1ANCHORGFP a été transfecté dans les cellules RK13 infectées par dépôt de 5 μ L d'un mélange réactionnel incubé 20 minutes à température ambiante et contenant 500 μ L d'OPTI-MEM, 10 μ g de plasmide et 33 μ L d'Xtreme-Gene HP. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C avec 5% CO₂ jusqu'à apparition de l'effet cytopathique.

II.2.3 Purification et production de HVE-1 ANCHORGFP

Après recombinaison, l'effet cytopathique a été observé quotidiennement et lorsqu'il fut de 100%, le surnageant de chaque puits a été récupéré et a été utilisé pour infecter de nouvelles cellules RK13ensemencées à 8000 cellules/puits en plaque 96 puits. L'apparition de plages fluorescentes a été suivie à l'aide du Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2.

Pour isoler les plages fluorescentes, le milieu a été retiré et les plages ont été piquées manuellement. Chaque plage a ensuite été utilisée pour infecter des cellules RK13, et un HVE-1 ANCHORGFP purifié a été obtenu au bout de 4 passages. 20 μ L de ce 4^{ème} passage ont été utilisés pour infecter une F75 cm² de RK13 et ainsi constituer une pré-production d'HVE-1 ANCHORGFP.

La pureté de cette pré-amplification a ensuite été mesurée par comptage manuel des plages fluorescentes. Pour cela, des cellules RK13 ont été infectées avec des dilutions successives de 10 en 10 de la pré-production d'HVE-1 ANCHORGFP et les plages ont été comptées après 48h d'infection.

Une fois la pureté d'HVE-1 ANCHORGFP vérifiée, le virus recombinant a été produit sur des cellules RK13ensemencées en 3 F150 cm². Lorsque l'ECP fut total, l'HVE-1 ANCHORGFP a été purifié par deux cycles de centrifugation, un premier de pré-clearing et un sur gradient de sucrose.

II.2.4 Titrage d'HVE-1 ANCHORGFP

Des cellules RK13 ont étéensemencées en plaques P96 Corning (8 000 cellules/puits) et incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Le lendemain, les RK13 ont été infectées avec 10 μ L de dilutions en série de raison 10 d'HVE-1 ANCHORGFP et remises à l'incubateur. 24h post-infection, les cellules ont été fixées avec une solution de formaline à 4% pendant 10 minutes à température ambiante, et les noyaux ont été marqués avec une solution saline (PBS) contenant

1µg/mL de Hoechst (Sigma). Le titre a ensuite été déterminé au Cx7 par quantification du nombre de cellules GFP positives et a été évalué à $5,5.10^8$ ffu/mL (ffu : unité formant fluorescence).

II.2.5 Caractérisation de HVE-1 ANCHOGFP

II.2.5.1 Caractérisation génomique

L'insertion du système ANCHOR™ dans le génome d'HVE-1 a été vérifiée par plusieurs PCRs. Les PCRs ANCHORGFP, ORF13 et ORF14 ont été réalisées avec les mêmes amorces et selon les mêmes conditions que celles décrites dans le tableau 11 (page 97). Une PCR permettant l'amplification des gènes ORF13, ORF14 et leur région intergénique a également été réalisée en utilisant l'amorce sens d'ORF13 et l'amorce anti-sens de ORF14 et un programme PCR spécifique (Tableau 13).

Amorces (taille)	Séquence 5' → 3'	Programme
ORF13 / ORF14		98°C 1min
Sens	GGAAT <i>ATTAAATTAATTA</i> AAGCGATACGGAATCGGGT	98°C 10s
Anti-sens	GGAAT <i>TTAATTAAGGGT</i> AGGTAGTAGGTGGG	53°C 5s
		72°C 180s

} x 30 cycles

Tableau 13. Amorces et programme PCR utilisés pour l'amplification de ORF13/ORF14 et leur région intergénique.

Les séquences en italiques correspondent à des nucléotides ajoutés pour améliorer l'hybridation des amorces.

II.2.5.2 Propriétés biologiques

Des cellules RK13 ont étéensemencées à 8000 cellules/puits en plaque P96 Corning et ont été infectées avec HVE-1 WT ou HVE-1 ANCHORGFP à MOI 0,008 24h post-ensemencement. La formation de l'effet cytopathique a été imagée quotidiennement au CX7. Pour l'étude de la production virale, des cellules RK13 ont étéensemencées à 250 000 cellules/puits en plaque 6 puits et infectées comme précédemment. Les surnageants ont ensuite été récoltés à 1j, 2j, 3j et 6j post-infection et titrés par la méthode des dilutions limites. La lecture des résultats a été réalisée après 72h d'infection.

Parallèlement à ces études, la réplication d'HVE-1 WT et d'HVE-1 ANCHORGFP a également été étudiée. Les cellules ont étéensemencées et infectées dans les conditions décrites

précédemment et l'ADN viral a été extrait à 0, 1j, 2j, 3j et 6j post-infection avec le kit One-4-all genomic DNA miniprep puis a été quantifié par qPCR.

II.2.5.3 Visualisation du cycle d'HVE-1 en temps réel

II.2.5.3.1 Suivi de l'infection et de la réplication d'HVE-1

Des cellules RK13 ont étéensemencées dans une boîte de culture à fond en verre de 35mm à 4 cadrans (CELLview™, Greiner Bio-one) à une densité de 85 000 cellules/cadran et incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Des cellules ED ont également été utilisées etensemencées à 500 000 cellules dans une boîte de pétri 35mm à fond en verre. Le lendemain, les RK13 ont été infectées avec HVE-1 ANCHORGFP à MOI 0,25 et les ED à MOI 20.

Le cycle d'infection et de réplication a été suivi quotidiennement à l'aide du Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2.

II.2.5.3.2 Marquage de l'actine

Après 24h ou 48h d'infection, les cellules ED et RK13 ont été fixées avec une solution de formaline à 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec une solution saline (PBS) avant d'être perméabilisées avec une solution de PBS 0,5% Triton x100 pendant 5 minutes. Après perméabilisation, la saturation des sites non spécifiques a été réalisée pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de PBS contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA). Pour le marquage de l'actine filamentaire, de la phalloïdine couplée au fluorophore Alexa Fluor™ 594 (Invitrogen) a été diluée dans une solution de PBS 1% BSA selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 45 minutes à température ambiante. Après incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS. Enfin, les noyaux cellulaires ont été marqués avec une solution de PBS Hoechst (1µg /mL). L'imagerie a ensuite été réalisée avec le Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2.

II.2.5.4 Quantification d'HVE-1 ANCHORGFP

II.2.5.4.1 Quantification en temps réel d'HVE-1 ANCHORGFP

La quantification de l'infection d'HVE-1 en temps réel a été réalisée sur RK13. Pour cela, 8 000 cellules ont étéensemencées dans les puits d'une plaque P96 Corning et incubées 24h à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Après incubation, les cellules ont été

traitées soit avec 1µL de DMSO (0,5% final), soit avec 1µM de ganciclovir (0,5% DMSO final) et ont été infectées avec HVE-1 ANCHORGFP à MOI 1.

Le nombre de cellules GFP positives a ensuite été quantifié en live 24h, 48h et 72h post-infection avec le CellInsight Cx7.

II.2.5.4.2 Calibration d'HVE-1 ANCHORGFP pour le HCS

Pour tester les capacités d'HVE-1 ANCHORGFP pour le criblage à haut contenu, des cellules RK13 ont étéensemencées en plaque P96 Corning et incubées comme décrit précédemment. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec une des plaques de la Prestwick 0,4mM à une concentration finale de 2µM dans 0,5% DMSO. Afin d'avoir un contrôle positif pour l'identification de molécules antivirales, la plaque utilisée contient le ganciclovir, qui est à l'heure actuelle, la molécule la plus efficace contre HVE-1 *in vitro*. Directement après traitement, les cellules ont été infectées avec 10µL d'HVE-1 ANCHORGFP à MOI 1 et incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 48 heures.

Après incubation, les cellules ont été fixées pendant 10 minutes à température ambiante avec une solution de formaline à 4%. Pour l'analyse, les noyaux ont été marqués avec une solution de PBS Hoechst (1µg/mL).

La quantification a ensuite été réalisée à l'aide du microscope à haut contenu Cx7 grâce à un algorithme adapté à partir de l'application « spot detector ».

Pour déterminer la robustesse de l'HVE-1 ANCHORGFP pour la détection de molécules antivirales, des contrôles négatifs correspondant à des cellules traitées avec 0,5% de DMSO mais non infectées ont été inclus dans chaque expérience. Ceci a ainsi permis de déterminer le Z' factor (ou Z'), un paramètre statistique témoignant de l'efficacité et de la fiabilité de la quantification. Pour sa détermination, le Z' factor prend en compte deux conditions : la condition pour laquelle le signal est maximal, appelée Cpos et la condition pour laquelle le signal est minimal, appelée Cneg et correspondant au bruit de fond de l'expérience.

Le Z' factor a été calculé selon la formule de Zhang et al [304]:

$$Z' \text{ factor} = 1 - \frac{3x \text{ EC}(\text{Cpos}) + 3x \text{ EC}(\text{Cneg})}{[\text{moyenne}(\text{Cpos}) - \text{moyenne}(\text{Cneg})]}$$

Avec Cpos correspondant aux conditions avec le signal maximal, c'est-à-dire les conditions traitées avec 0,5% DMSO et infectées avec HVE-1 ANCHORGFP ; et Cneg correspondant aux conditions avec le signal minimal représentées par les cellules traitées avec 0,5% DMSO mais non infectées. EC : écart-type.

Ainsi, une expérience dont le Z' factor est compris entre 0,5 et 1 ($0,5 \leq Z' < 1$) présente une bonne différence entre le bruit de fond et le signal spécifique quantifié et est considérée comme excellente. Des valeurs comprises entre 0 et 0,5 sont considérées comme marginales avec une faible séparation entre le signal spécifique et le bruit de fond, tandis que des valeurs inférieures à 0 sont incompatibles avec une expérience à haut contenu.

III. Résultats

III.1 Construction du plasmide de transfert pUC19HVE1ANCHORGFP

III.1.1 Stratégie générale

Par le fort potentiel de recombinaison des alphaherpèsvirus *in vitro* [305], la méthode de recombinaison homologue en cellules eucaryotes, correspondant à l'échange d'un fragment d'ADN entre deux génomes, a été privilégiée pour insérer la technologie ANCHOR™ dans le génome de l'herpèsvirus équin de type 1. Pour cela, un plasmide de transfert permettant d'apporter le système ANCHOR™ a dû être développé.

Afin de favoriser la sélection des virus recombinants, le gène de sélection *eco.gpt* d'*Escherichia coli* a été inséré dans le plasmide de transfert. Principalement utilisé pour sélectionner des poxvirus recombinants [306] [307] [308], le gène *eco.gpt* a également fait ses preuves sur les herpèsvirus, et plus particulièrement sur le virus de la maladie de Marek et les cytomégalovirus humain et murin [309] [310] [311]. Le gène *eco.gpt* permet l'expression d'une enzyme xanthine guanine phosphoryltransférase non présente dans les cellules de mammifères, et permettant à ces dernières de surmonter le blocage de la synthèse d'ADN induit par l'acide mycophénolique et l'aminoptérine et ainsi de poursuivre leur croissance.

Pour que le gène *eco.gpt* puisse s'exprimer, il est également nécessaire de le placer sous la dépendance d'un promoteur. Ainsi, suite au succès du promoteur du cytomégalovirus humain (pCMV) pour la sélection de virus de Marek recombinants, le promoteur pCMV a également été utilisé dans cette étude pour permettre l'expression d'*eco.gpt*.

Concernant le choix des zones d'homologie, de nombreuses études sur le clonage d'herpèsvirus à l'intérieur de BACs sont disponibles et mettent en lumière plusieurs zones d'intérêt. En 2004, les travaux de Nagaike ont notamment démontré qu'il était possible d'insérer un fragment d'ADN d'intérêt entre les gènes ORF11 et ORF12, codant respectivement pour les protéines

du tégment VP11/12 et VP13/14, sans impacter la réplication et la production virale de VZV [312]. Ainsi, la région intergénique entre les gènes non essentiels ORF13 et ORF14 d'HVE-1, homologues des gènes ORF11 et ORF12 de VZV, a été ciblée pour l'intégration du système ANCHOR™ et l'obtention d'un HVE-1 recombinant de pleine taille. Afin d'augmenter les chances de réussite de la recombinaison homologue et pour préserver les séquences codantes des gènes ORF13 et ORF14, les zones d'homologie amplifiées contiendront l'intégralité des gènes considérés pour une taille totale de plus de 2 000 nucléotides.

Cependant, une stratégie de clonage spécifique a été mise en place afin que ce plasmide de transfert soit facilement adaptable. En effet, dans l'optique d'utiliser ce plasmide pour marquer d'autres virus, il était nécessaire que les zones d'homologie soient les derniers éléments à être clonés. Pour cela, une analyse précise des séquences de pUC19, du gène *eco.gpt*, du promoteur CMV, du système ANCHOR™ et de différentes zones d'homologie de plusieurs herpèsvirus a été réalisée afin de déterminer les sites de restriction absents dans l'ensemble de ces éléments et leur ordre d'insertion. De plus, afin de faciliter l'insertion des zones d'homologie et d'appliquer cette stratégie à de nombreux virus, l'utilisation de sites de restriction de plus de 8 nucléotides a été privilégiée. Ainsi, la construction du plasmide de transfert pUC19 HVE1ANCHORGFP a dû être réalisée dans un ordre précis.

III.1.2 Clonage de pUC19HVE1ANCHORGFP

Pour l'insertion des différents éléments et le développement du plasmide de transfert, il était nécessaire que le vecteur d'expression pUC19 contienne l'ensemble des sites de restriction nécessaires aux étapes de clonage. La première étape a donc été d'insérer ces différents sites de restriction.

III.1.2.1 1^{ère} étape : insertion de *eco.gpt* et des sites de restriction

Pour la première étape du clonage, la séquence du gène *eco.gpt* ainsi que celles des sites de restriction NdeI, SwaI, PacI, NotI, BglII, BamHI, KasI, et AsiSI ont été synthétisées par Eurofins genomics à l'intérieur d'un de leur plasmide propriétaire afin de former le plasmide pEX-A128 E.GPT. Afin de permettre la maturation de l'ARN messager (ARNm) et de faciliter la traduction d'*eco.gpt*, un signal de poly adénylation et une séquence de Kozak ont été également ajoutés et synthétisés respectivement en aval et en amont de la séquence d'*eco.gpt*. Après amplification par PCR avec les amorces sens et anti-sens E.GPT décrites dans le tableau 11 (page 97), la séquence d'intérêt contenant les sites de restriction et le gène *eco.gpt* a été

clonée à l'intérieur de pUC19 entre les sites NdeI et HindIII par digestion enzymatique, éliminant ainsi une grande partie de la portion LacZ α et le MCS initialement présents, pour former le plasmide pUC19 E.GPT (Figure 32).

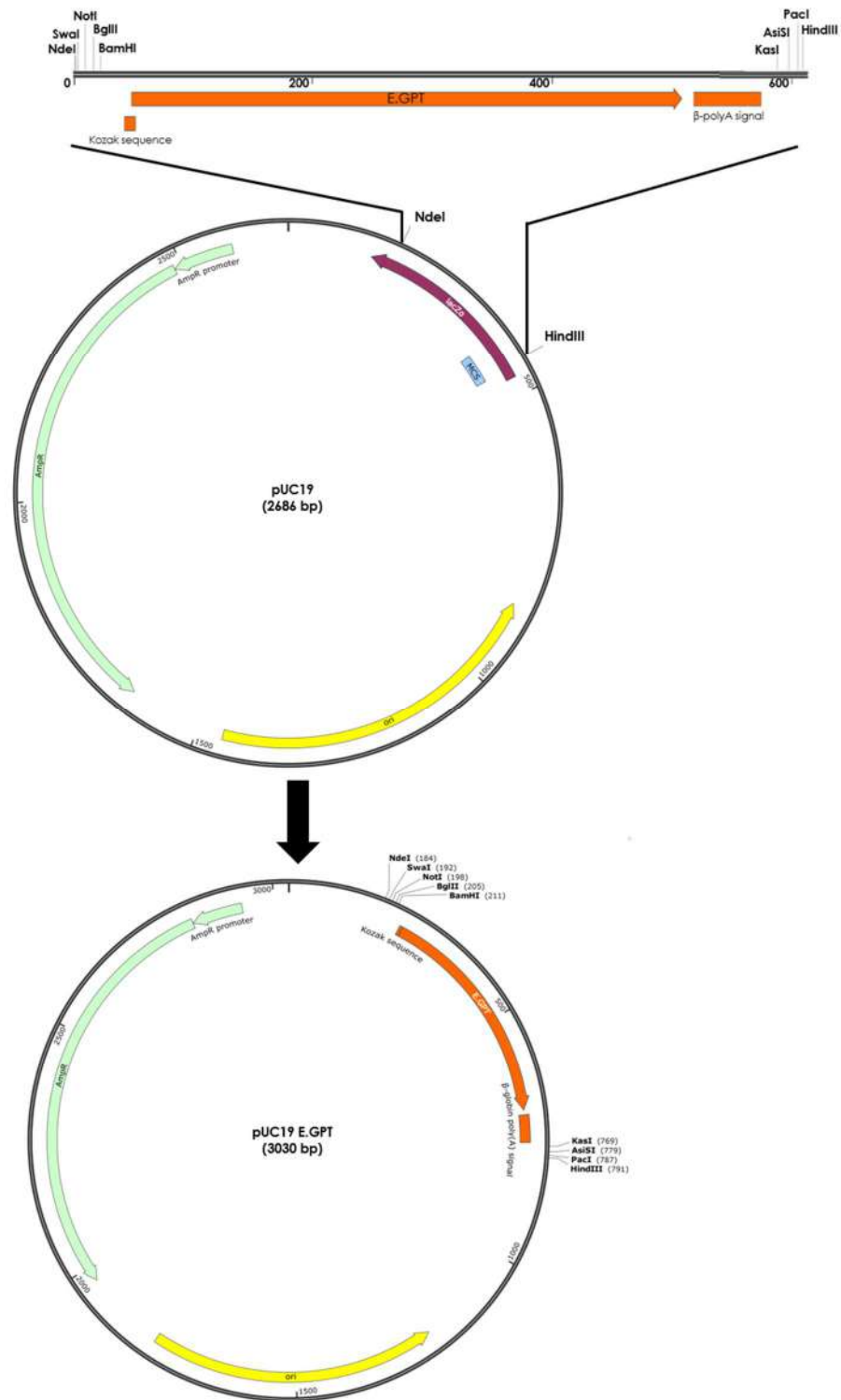


Figure 32. Insertion de E.GPT et des sites de restriction dans pUC19.

Le gène *eco.gpt* (orange) ainsi que les sites de restriction SwaI, NotI, BglII, BamHI, KasI, AsiSI et PacI ont été insérés entre les sites NdeI et HindIII de pUC19 pour former le plasmide pUC19 E.GPT.

L'insertion du fragment d'intérêt dans tous les clones obtenus a été vérifiée par digestion avec les enzymes *KasI*, *XbaI* et *ScaI-HF* et le résultat a été visualisé après électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 33).

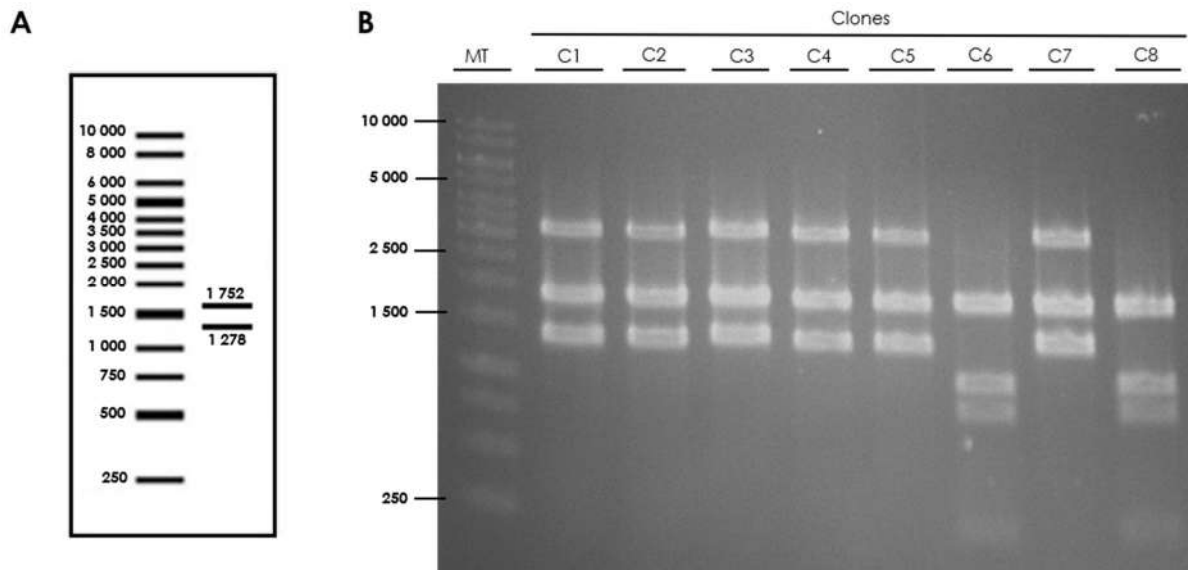


Figure 33. Vérification de l'insertion de la séquence *eco.gpt* dans le plasmide pUC19 par digestion *KasI* / *ScaI-HF* et *XbaI*.

A. Profil de digestion attendu. B. Gel d'électrophorèse. MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

Les clones C1, C2, C3, C4, C5 et C7 présentent le profil attendu, avec une bande à 1 752 nt et une autre à 1 278 nt, correspondant au résultat de l'insertion de *E.GPT* dans pUC19 ; tandis que les clones C6 et C8 correspondent au vecteur de base. Une bande supplémentaire de haut poids moléculaire est également présente pour l'ensemble des conditions et peut correspondre à du plasmide non digéré.

Afin de confirmer les résultats précédents, une deuxième digestion utilisant les enzymes *BamHI* et *HindIII* a été réalisée sur les clones C3 et C4 positifs et le clone C8 négatif (Figure 34).

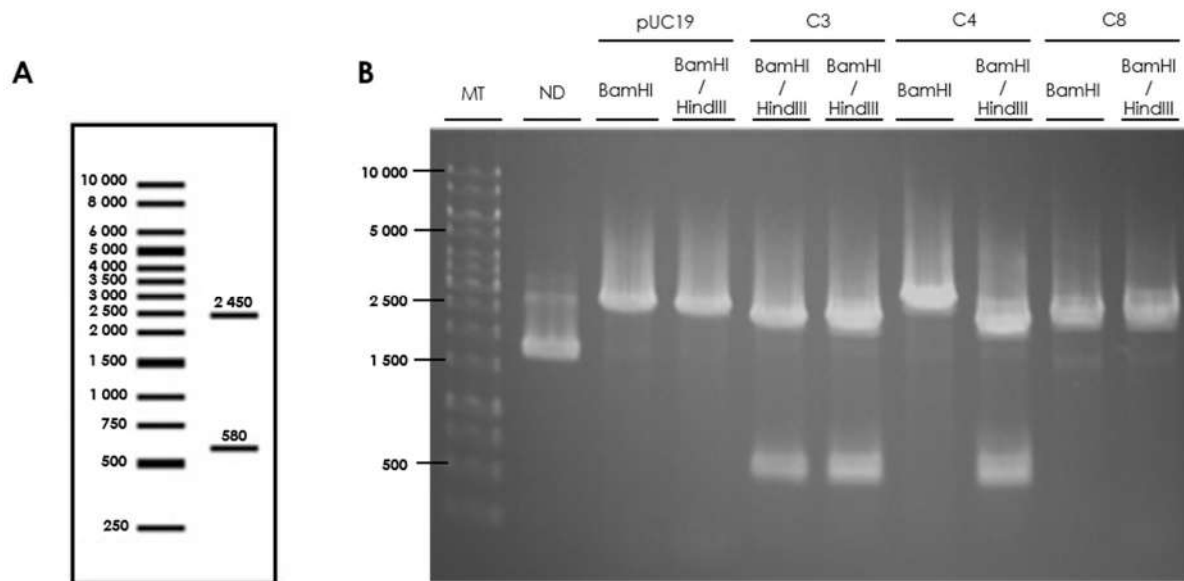


Figure 34. Vérification des clones pUC19 ou pUC19 E.GPT par digestion BamHI ou BamHI / HindIII.

A. Profil de digestion BamHI/ HindIII attendu. B. Gel d'électrophorèse. Les clones et le plasmide contrôle pUC19 ont été digérés par BamHI seule ou BamHI et HindIII (hormis C3 qui a été digéré deux fois par BamHI/HindIII). ND : plasmide pUC19 non digéré. MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

Après insertion, la digestion de pUC19 E.GPT par BamHI doit entraîner la formation d'une bande unique de 3 030 nt et celle par BamHI / HindIII doit induire la formation de deux bandes à 580 nt et 2 450 nt, alors que la digestion de pUC19 n'induit l'apparition que d'une seule bande de 2 686 nt quelles que soient les enzymes utilisées.

On peut observer que les clones C3 et C4 présentent les profils de digestion attendus et correspondent donc bien au plasmide pUC19 E.GPT.

III.1.2.2 2^{ème} étape : insertion du promoteur pCMV

Afin que le gène *eco.gpt* puisse s'exprimer, la séquence correspondant au promoteur pCMV et à son enhancer a été insérée dans le plasmide pUC19 E.GPT, en amont de *eco.gpt*. Pour cela, le plasmide pcDNA5FRT a été digéré avec les enzymes BglII et BamHI. Le résultat de la digestion a ensuite été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose et la bande d'ADN correspondant à la séquence d'intérêt (912 nt) a été extraite du gel, puis purifiée avec le kit Gel and PCR Clean-Up.

En parallèle, le plasmide pUC19 E.GPT a été digéré par BamHI et BglII et a ensuite subi une étape de dé-phosphorylation, avant d'être purifié de la même façon que la séquence du promoteur pCMV. Après purification, ces deux éléments ont été ligués afin de former le plasmide pUC19 pCMV E.GPT (Figure 35).

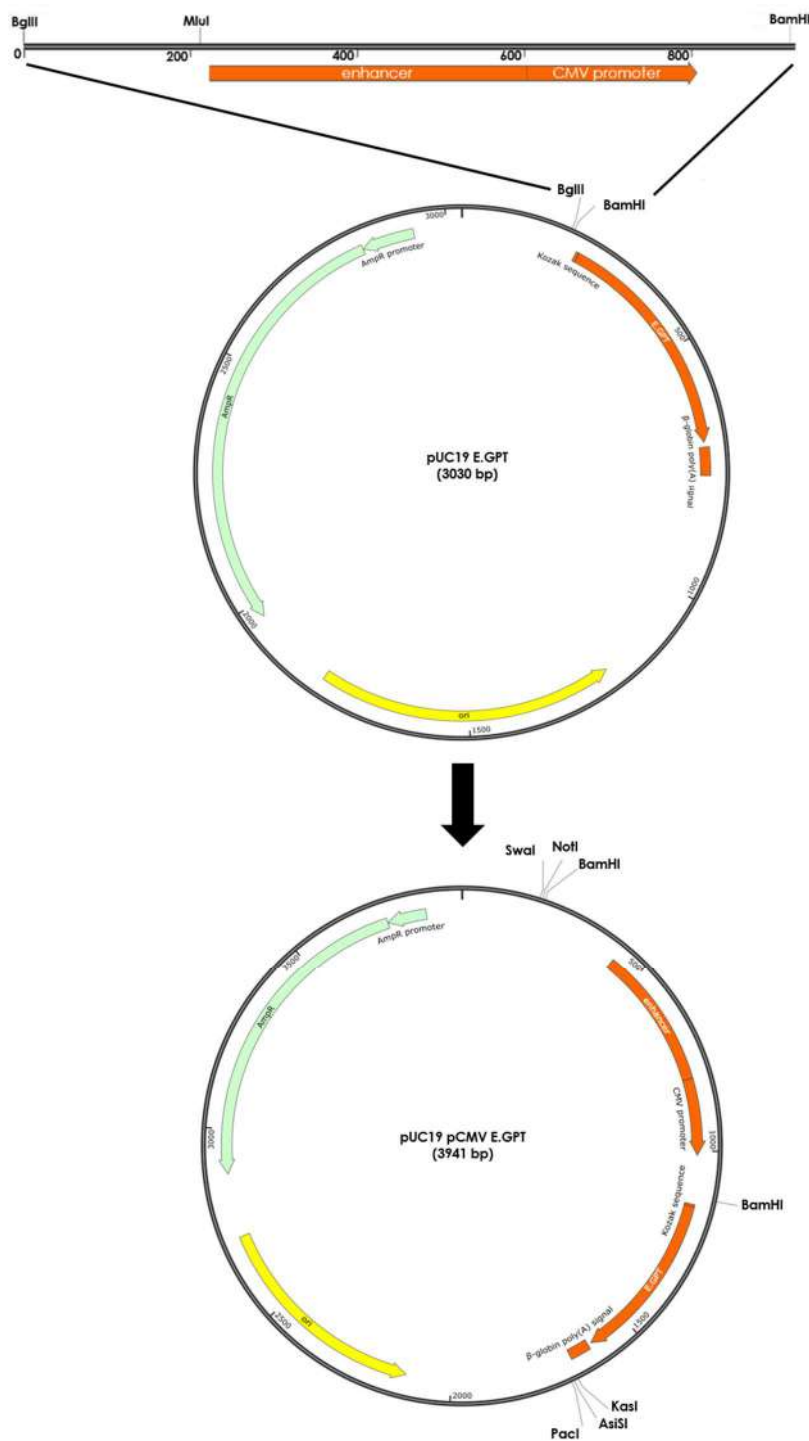


Figure 35. Représentation schématique de l'insertion du promoteur pCMV dans pUC19 E.GPT

Seuls les sites de restriction des enzymes utilisées pour toutes les étapes de clonage et la vérification de l'insertion de pCMV sont représentés.

L'insertion du promoteur pCMV a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose après digestion des clones obtenus par les enzymes BglII et MluI (Figure 36).

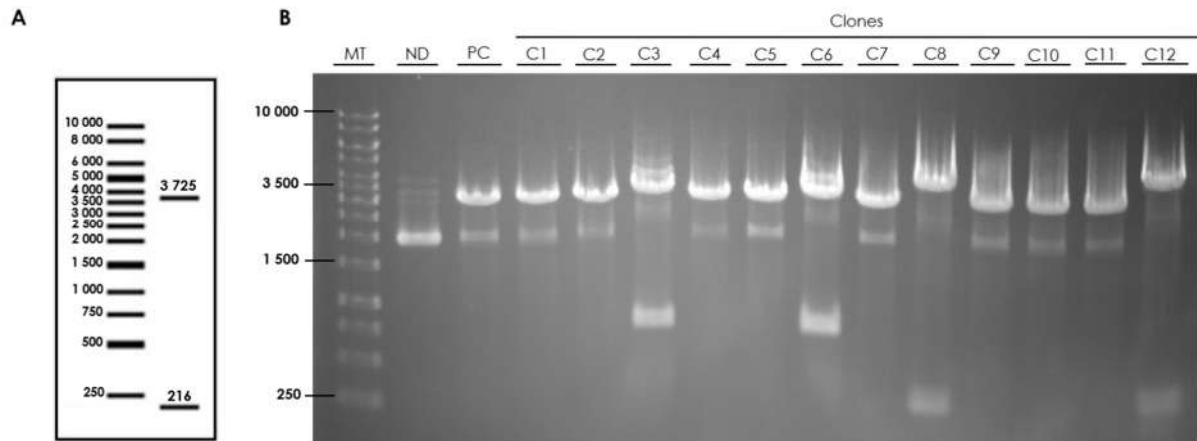


Figure 36. Digestion des clones obtenus par BglII et MluI après clonage du promoteur pCMV dans pUC19 E.GPT.

A. Profil de digestion BglII / MluI attendu. B. Gel d'électrophorèse. Le plasmide contrôle (PC) et les clones ont été digérés par BglII et MluI. ND : plasmide pUC19 E.GPT non digéré. PC : plasmide contrôle pUC19 E.GPT. MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

Le site MluI étant apporté par la séquence de pCMV, la digestion des clones correspondant au plasmide pUC19 pCMV E.GPT doit former deux bandes avec une taille respective de 216 nt et de 3 725 nt. Ainsi, sur l'ensemble des 12 clones obtenus après ligation, seuls deux clones (C8 et C12) présentent le profil de digestion attendu. Huit d'entre eux correspondent à pUC19 E.GPT et n'ont donc pas inséré la séquence pCMV, tandis que les clones C3 et C6 présentent un profil de digestion original pouvant correspondre à l'insertion du promoteur CMV dans une mauvaise orientation.

Afin de confirmer que le promoteur pCMV a bien été inséré dans la bonne orientation, la séquence allant du promoteur pCMV jusqu'à la fin du gène *eco.gpt* a été amplifiée par PCR puis séquencée.

III.1.2.3 3^{ème} étape : insertion du système ANCHOR™

Pour le marquage de l'ADN, la cassette auto-fluorescente comprenant la séquence ANCH et le gène codant pour les protéines ORGFP, sous l'expression du promoteur SV40, a été amplifiée par PCR depuis le plasmide pGEM7SV40ANCHORGFP avec les amorces ANCHORGFP décrites dans le tableau 11 (page 97). Cette PCR entraîne l'amplification des éléments cités ci-dessus ainsi que celle d'une séquence d'espacement (*spacer*) de 366 nucléotides en aval de ANCH afin de s'assurer que la fixation des protéines ORGFP sur l'ADN adjacent à la séquence ANCH ne réprime par l'expression du gène ORF14. Après amplification, le produit PCR et le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ont été digérés par les enzymes AsiSI et KasI (Figure 37).

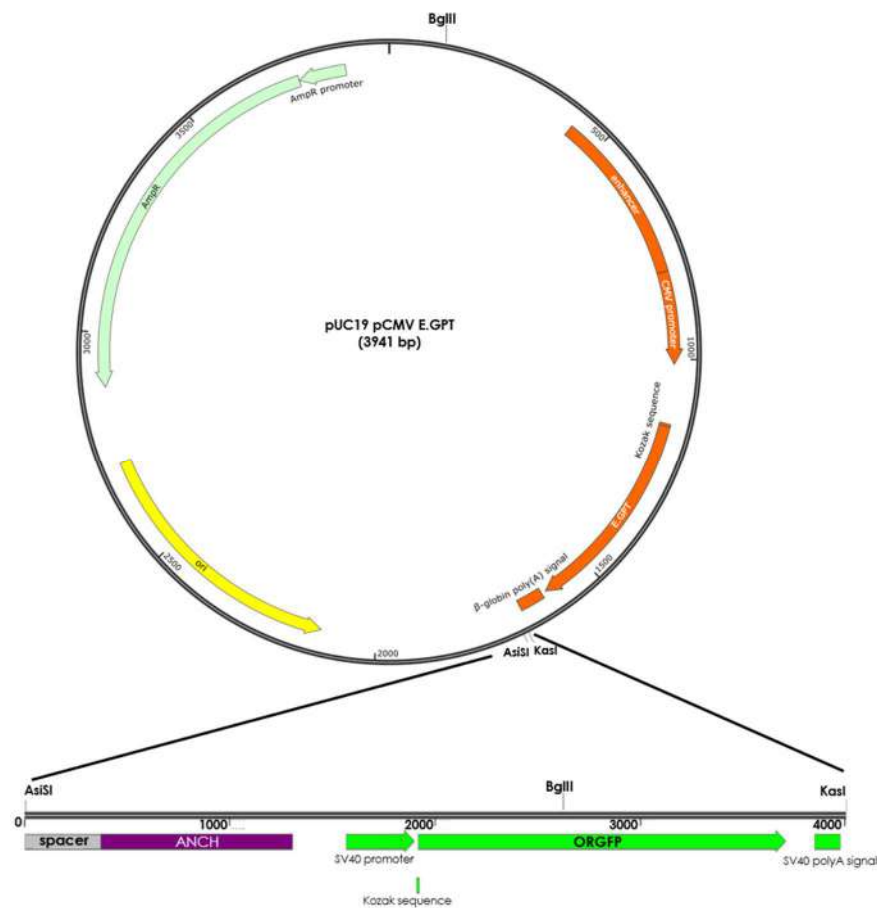


Figure 37. Clonage de la cassette auto-fluorescente ANCHOR™ dans pUC19 pCMV E.GPT.

Seuls les sites de restriction des enzymes utilisées pour le clonage et la vérification de l'insertion sont représentés.

Après ligation et transformation, les clones obtenus ont été vérifiés par digestion avec l'enzyme BglIII (Figure 38).

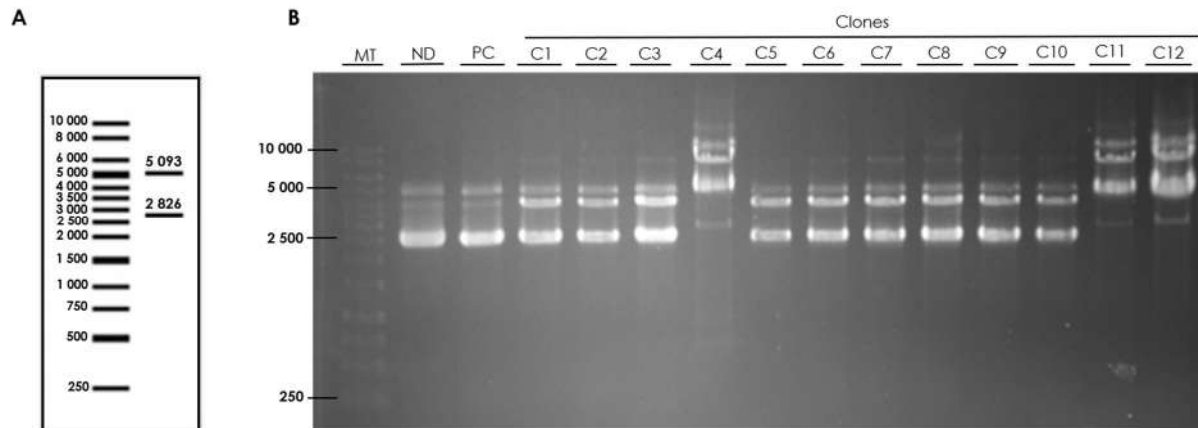


Figure 38. Résultats de la digestion BglIII des clones obtenus après ligation du système ANCHOR™ dans le plasmide pUC19 pCMV E.GPT.

A. Profil de digestion BglIII attendu. B. Gel d'électrophorèse. ND : plasmide pUC19 pCMV E.GPT non digéré. PC : plasmide pUC19 pCMV E.GPT digéré. MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

Lors de l'insertion du système ANCHOR™ dans le plasmide pUC19 pCMV E.GPT, la digestion par BglIII doit couper le plasmide à deux endroits, entraînant ainsi la formation de deux bandes dont les tailles attendues sont de 2 826 nt pour la plus petite et de 5 093 nt pour la plus grande. Sur l'ensemble des clones obtenus, 3 semblent présenter les deux bandes attendues (C4, C11, C12). Cependant, la présence d'ADN non digéré pour l'ensemble des conditions ne permet pas d'affirmer que le système a bien été inséré.

Pour confirmer la présence de la cassette auto-fluorescente, une PCR utilisant les mêmes amorces que pour l'amplification du fragment ANCHORGFP a été réalisée sur les 3 clones dont le profil de digestion est similaire à celui attendu (Figure 39).

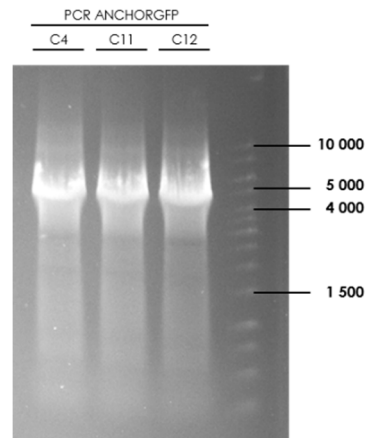


Figure 39. Résultat de la PCR ANCHORGFP sur les 3 clones supposés positifs.

Les 3 clones présentent un signal positif suite à la PCR ANCHORGFP avec une bande dont la taille est similaire à celle attendue (4 004 nt), confirmant que le système est bien présent dans ces 3 clones et que le clonage a fonctionné.

Afin de vérifier que l'insertion n'a pas altéré la fonctionnalité du système ANCHOR™, le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP a été transfecté dans des cellules HeLa et la fluorescence a été observée 48h post-infection à l'aide du Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2 (Figure 40).

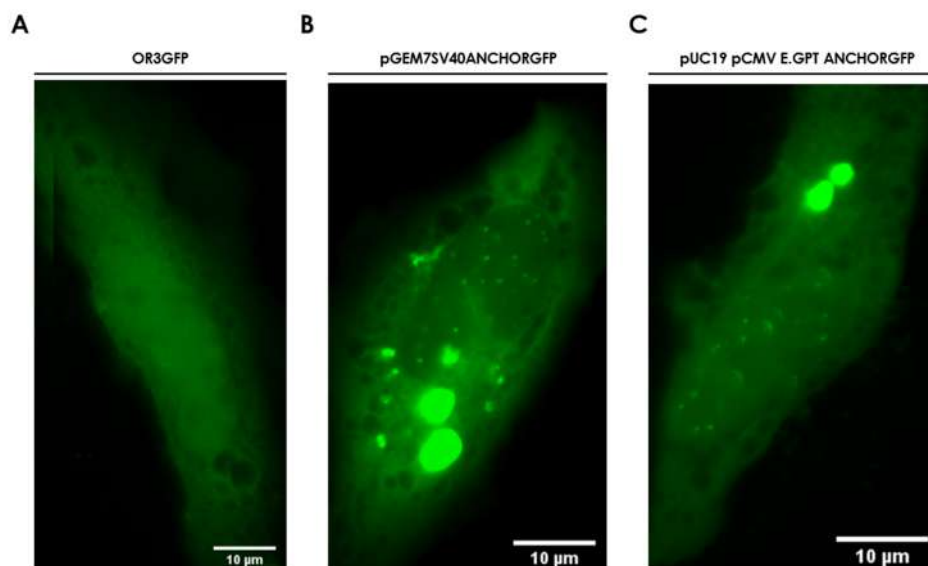


Figure 40. Expression du système ANCHOR™.

Cellules HeLa transfectées avec un plasmide contenant uniquement OR-GFP (A), ou avec le plasmide pGEM7SV40ANCHORGFP contenant ANCH et ORGFP (B) ou le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP (C). Acquisition réalisée avec le Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2, objectif 63x, 48h post-transfection. Barre d'échelle = 10 µm.

Lorsque la séquence ANCH n'est pas présente, la transfection des cellules avec un plasmide contenant uniquement ORGFP entraîne l'apparition d'un signal diffus dans la cellule, correspondant à l'expression des protéines ORGFP. En effet, la protéine ORGFP est dépourvue de signal de localisation type NLS et diffuse librement dans le volume cellulaire (Figure 40A). La transfection avec le plasmide pGEM7SV40ANCHORGFP contenant le système ANCHOR™ au complet entraîne en plus la formation de signaux ponctiformes correspondant à la localisation des plasmides (Figure 40B). On peut observer que la transfection du plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP induit l'apparition d'un signal similaire à celui obtenu avec pGEM7SV40ANCHORGFP, avec formation de spots fluorescents (Figure 40C), signifiant que la cassette ANCHORGFP présente dans le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP est fonctionnelle.

Suite à ces trois étapes de clonage, le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP contenant le gène de sélection *eco.gpt* sous l'expression du promoteur CMV et la technologie ANCHOR™ a été développé (Figure 41).

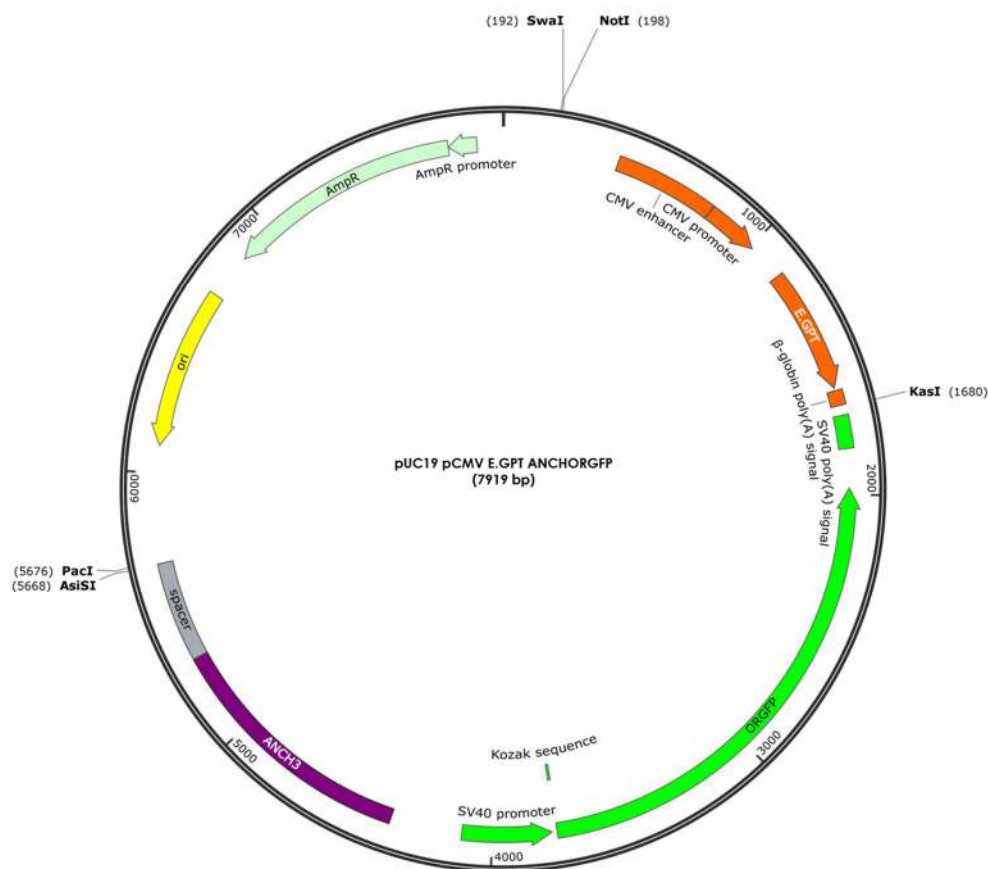


Figure 41. Carte du plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP.

Grâce à ses capacités de sélection et de marquage de l'ADN, ce plasmide représente ainsi un outil très intéressant pour un clonage rapide des virus à ADN par recombinaison homologue puisque seules les zones d'homologie doivent être insérées afin d'obtenir un plasmide de transfert complet et fonctionnel.

III.1.2.4 4^{ème} étape : insertion de la première zone d'homologie (ORF14)

La première zone d'homologie a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN d'HVE-1 par l'utilisation du couple d'amorces ORF14 HVE-1 décrits dans le tableau 11 (page 97). Cette PCR permet ainsi l'obtention d'un fragment d'ADN de 2 422 nt contenant le gène ORF14 dans son intégralité (nucléotides 17 954 à 20 347 du génome HVE-1 GenBank NC_001491.2). Après purification, cette zone d'homologie a été clonée dans pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP après digestion avec les enzymes AsiSI et PacI, déphosphorylation du plasmide digéré et purification afin de former le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 (Figure 42).

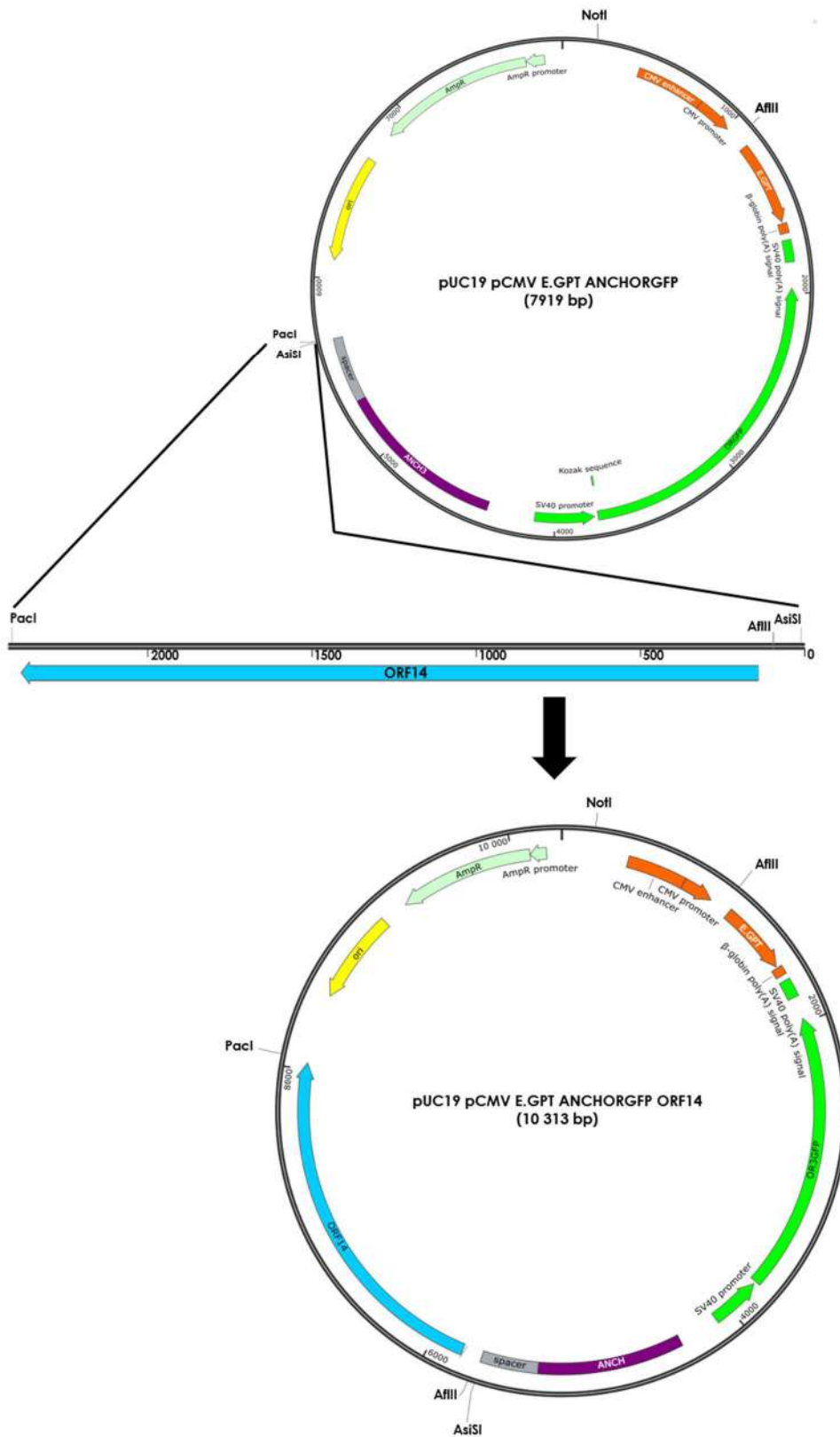


Figure 42. Insertion de la première zone d'homologie ORF14 entre les sites AsiSI et PacI du plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP.

Seuls les sites de restriction des enzymes utilisées pour le clonage et la vérification de l'insertion sont représentés.

Pour vérifier l'insertion d'ORF14, une digestion par NotI a d'abord été réalisée (Figure 43).

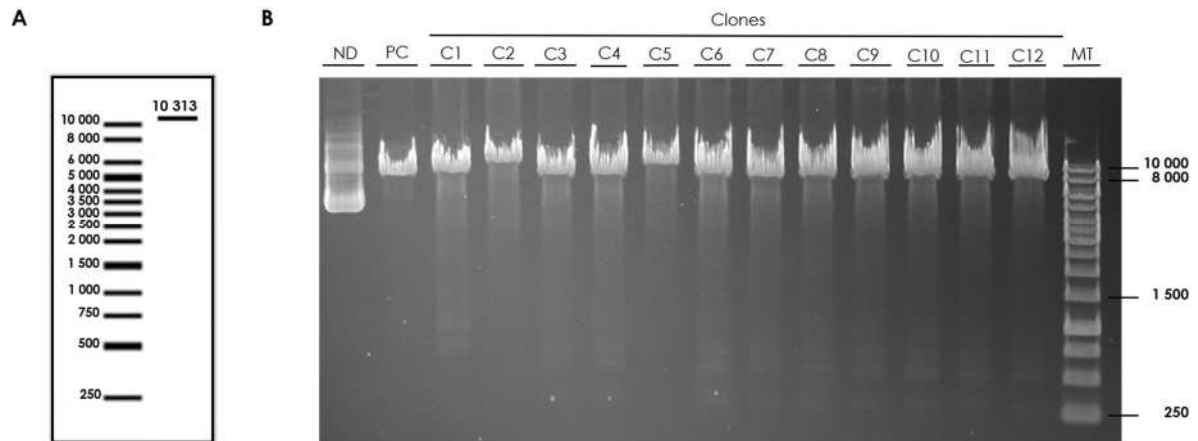


Figure 43. Vérification du clonage du gène ORF14 dans pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP par digestion NotI.

A. Profil de digestion NotI attendu. B. Gel d'électrophorèse. ND : plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP non digéré. PC : plasmide contrôle pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP digéré. MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

L'insertion de la séquence ORF14 HVE-1 induit une forte augmentation de la taille du plasmide. Ainsi, une digestion par le site de restriction unique NotI doit entraîner l'apparition d'une bande dont la taille est supérieure à 10 000 nt (10 313 nt) si le clonage a réussi, ou d'une bande à 7 919 nt si le clonage n'a pas fonctionné. La plupart des clones digérés ont un profil similaire à celui de pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP et ne contiennent donc pas la zone d'homologie. Cependant, les clones C2 et C5 présentent une bande de taille supérieure pouvant correspondre à celle attendue pour le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14.

Une PCR ORF14 a ensuite été réalisée sur les deux clones supposés positifs et le résultat a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 44).

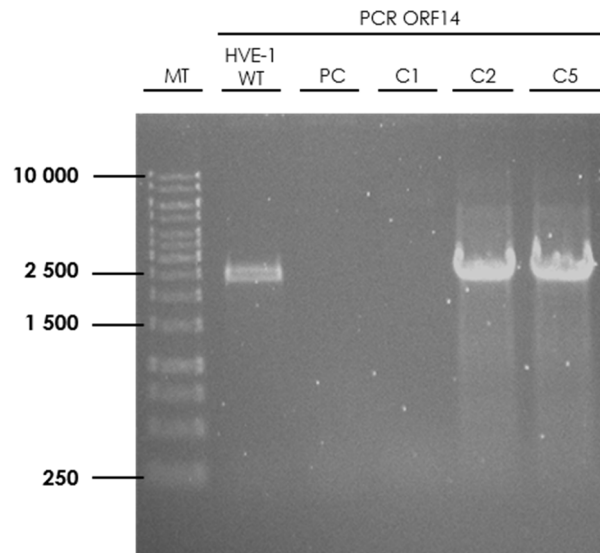


Figure 44. Vérification de la présence du gène ORF14 dans les clones C1, C2 et C5 obtenus après ligation dans pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP.

MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas). PC : contrôle négatif pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP. HVE-1 WT : contrôle positif.

Un signal identique à celui obtenu pour l'ADN parental d'HVE-1 WT peut être observé pour les 2 clones avec l'obtention d'une bande d'environ 2 400 nt, alors que les deux contrôles négatifs, correspondant au plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP et à un des clones négatifs, ne présentent aucune bande. Les clones C2 et C5 contiennent donc le gène ORF14 d'HVE-1.

Cependant, comme le site PacI est capable de liguer les extrémités digérées au niveau de AsiSI et ainsi de re-crée un site AsiSI, il est possible que la séquence ORF14 se soit insérée dans la mauvaise orientation. Pour déterminer le sens d'insertion, une digestion par AflII a été réalisée sur les clones C2 et C5 (Figure 45).

Le site AflII étant localisé à l'extrémité 5' de la zone d'homologie comprenant ORF14, la digestion du plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 bien orienté doit donner deux bandes de taille relativement proche (4 608 nt et 5 705 nt) (Figure 45A) alors que si l'insertion est dans l'autre sens, deux bandes de taille respective de 3 391 nt et 6 922 nt sont attendues (Figure 45B).

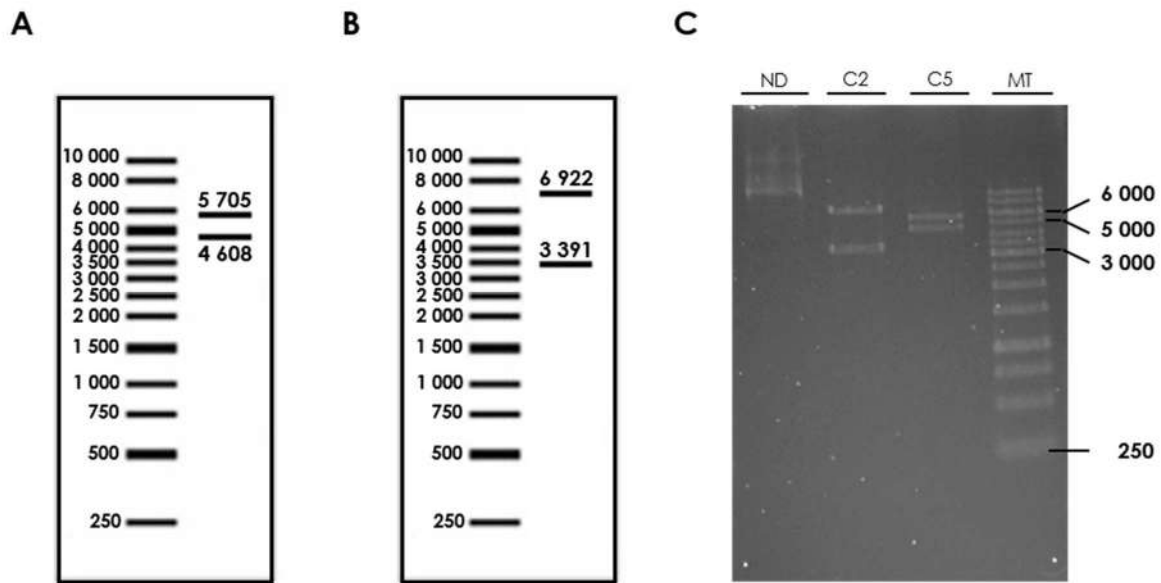


Figure 45. Vérification de l'orientation du gène ORF14 dans les clones pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 obtenus par digestion avec AflII.

A. Profil de digestion AflII attendu lors d'une insertion dans le bon sens. B. Profil de digestion attendu si insertion dans la mauvaise orientation. C. Gel d'électrophorèse. ND : plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP non digéré. MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

Sur les deux clones contenant la séquence du gène ORF14 d'HVE-1, seul le clone C5 correspond au profil attendu et présente une bonne orientation du gène ORF14. Ce clone est ainsi défini comme le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 et servira pour l'insertion de la dernière zone d'homologie.

III.1.2.5 5^{ème} étape : insertion de la deuxième zone d'homologie (ORF13)

Pour achever la construction du plasmide de transfert, une séquence de 2 694 nt entre les positions 15 296 et 17 953 d'HVE-1 WT contenant le gène ORF13 pleine taille a été amplifiée par PCR à partir des amorces ORF13 HVE-1.

Après purification, le gène ORF13 a été inséré dans le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 au niveau des sites de restriction SwaI et NotI (Figure 46).

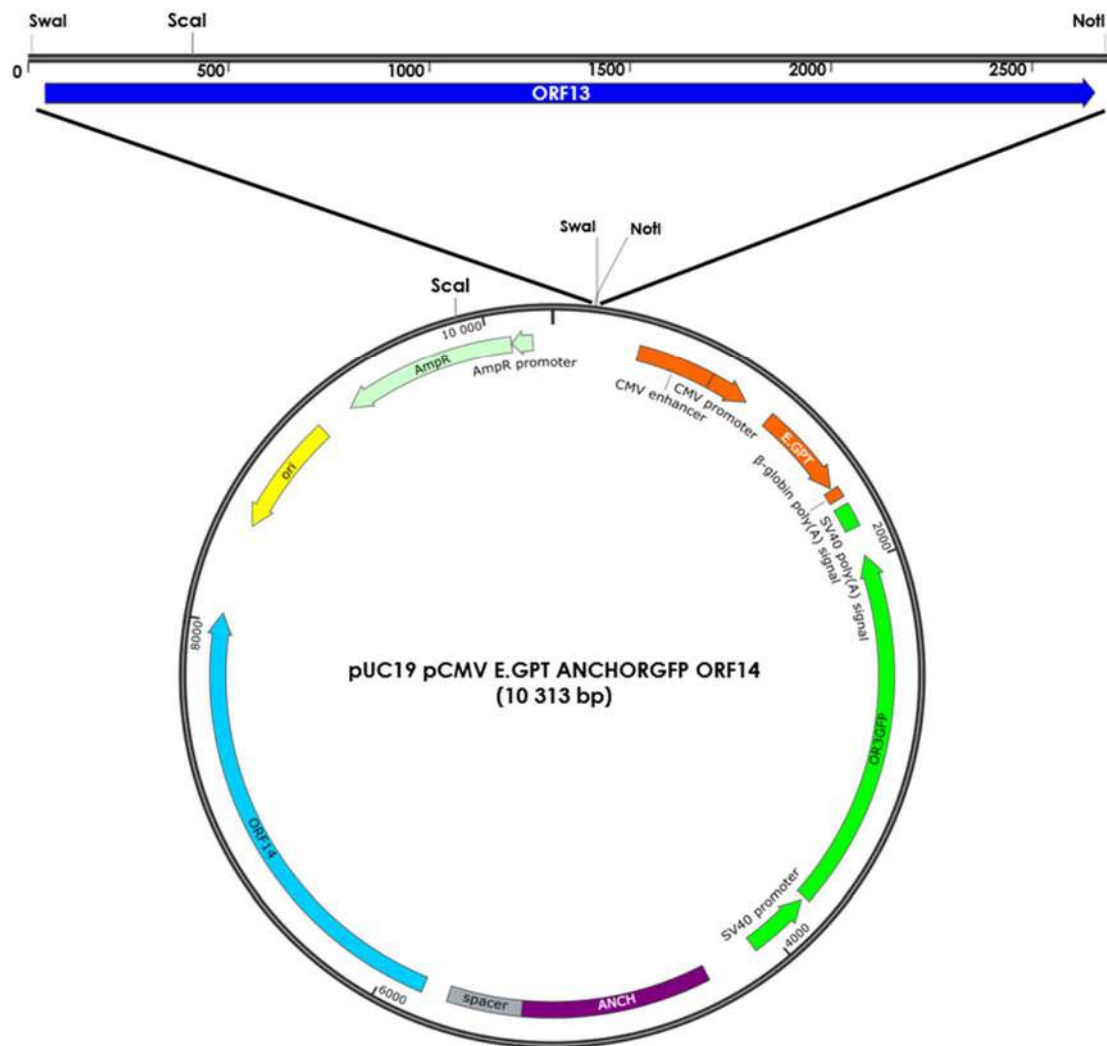


Figure 46. Représentation schématique du clonage de la 2^{ème} zone d'homologie ORF13 dans le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHOR GFP ORF14.

Seuls les sites de restriction des enzymes utilisées pour le clonage et la vérification de l'insertion sont représentés.

Suite à la ligation de ces deux éléments, les clones obtenus après transformation bactérienne ont été vérifiés par digestion avec l'enzyme de restriction ScaI (Figure 47).

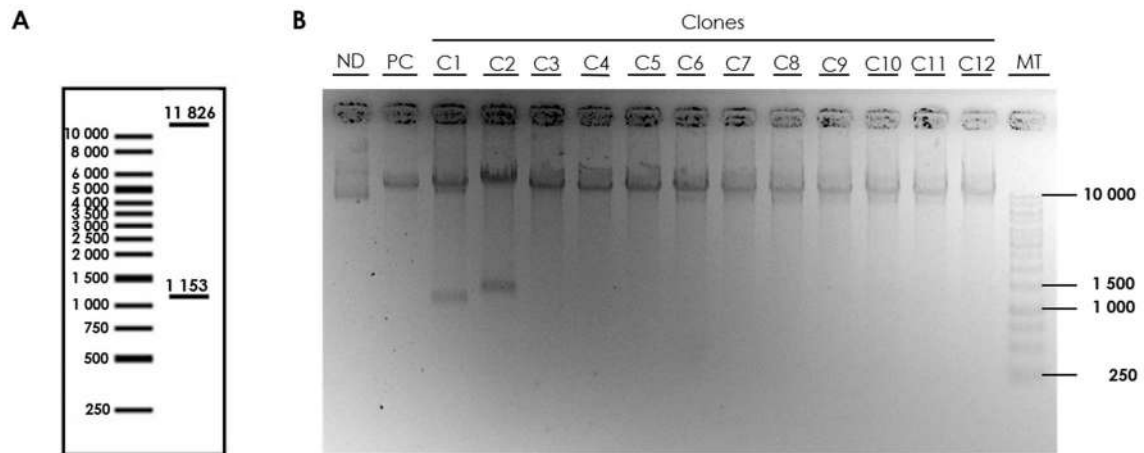


Figure 47. Digestion Scal des clones obtenus après ligation du système de ORF13 dans pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14.

A. Profil de digestion par Scal attendu. B. Gel d'électrophorèse. ND : plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 non digéré. PC : plasmide contrôle pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 digéré MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

Ainsi, 2 des 12 clones obtenus présentent un profil différent de celui du contrôle négatif pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 : le clone C2 qui présente exactement le profil attendu, et le clone C1 dont le profil pourrait correspondre mais qui présente une bande inférieure de plus petite taille.

Tout comme précédemment, afin de s'assurer de la présence du gène ORF13 dans le plasmide de transfert, une PCR a été réalisée et a permis de confirmer la bonne insertion de la séquence dans le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14 (Figure 48).

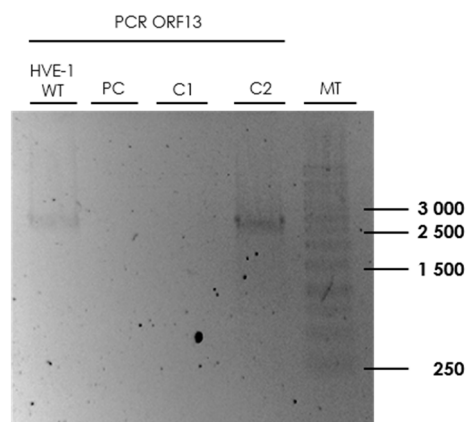


Figure 48. PCR ORF13 des clones pUC19 HVE-1 ANCHORGFP.

HVE-1 WT : contrôle positif. PC : contrôle négatif pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP ORF14. MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas).

On peut observer que seul le clone C2 présente un signal PCR dont la taille est identique à celle du contrôle positif HVE-1 WT, confirmant que le gène ORF13 a bien été inséré dans le plasmide de transfert.

Le plasmide de transfert, appelé pUC19HVE1ANCHORGFP est désormais complet et contient tous les éléments nécessaires pour la recombinaison homologue (Figure 49).

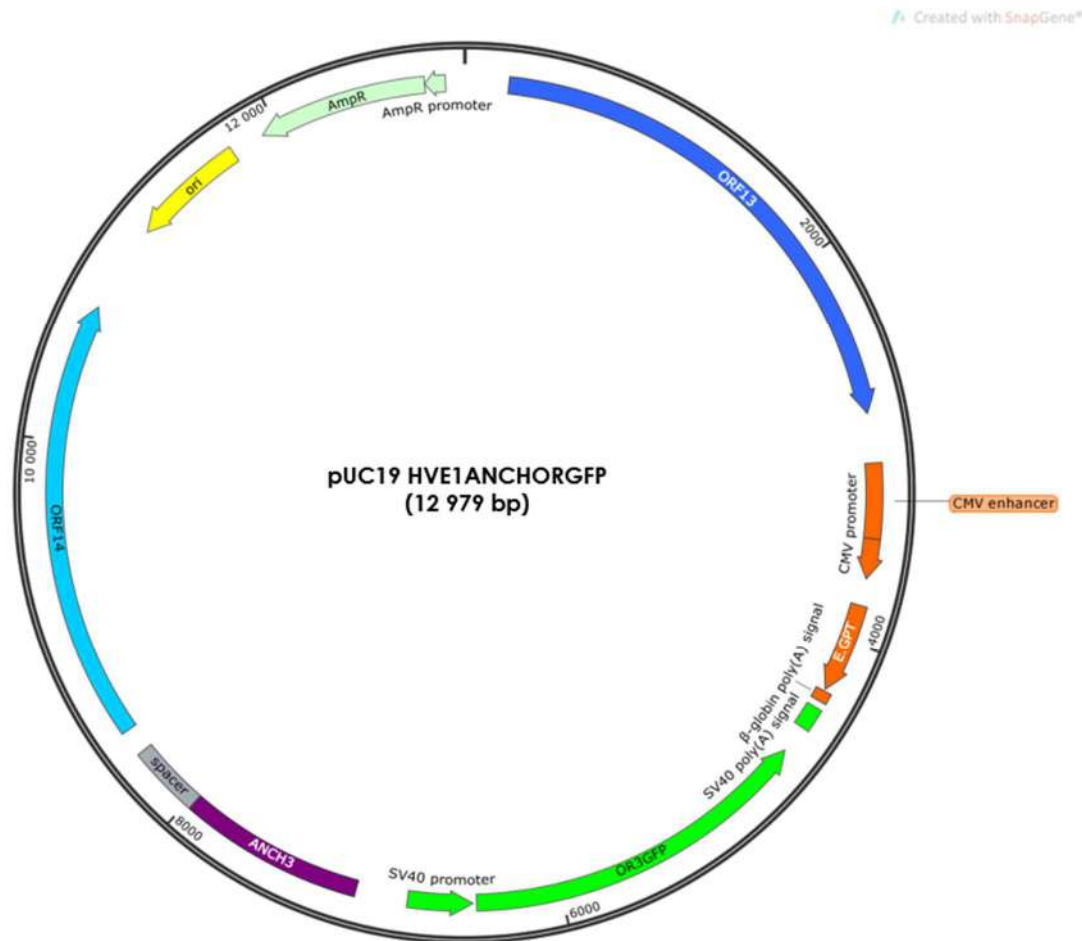


Figure 49. Carte du plasmide de transfert pUC19 HVE1ANCHORGFP.

Avant de passer à l'étape de recombinaison homologue, l'expression du système ANCHOR™ a été contrôlée par transfection du plasmide pUC19HVE1ANCHORGFP dans les cellules HeLa (Figure 50 A-B) et RK13 (Figure 50C) afin de vérifier que l'insertion des zones d'homologie n'ait pas altéré sa fonctionnalité, et que la recombinaison homologue soit bien possible.

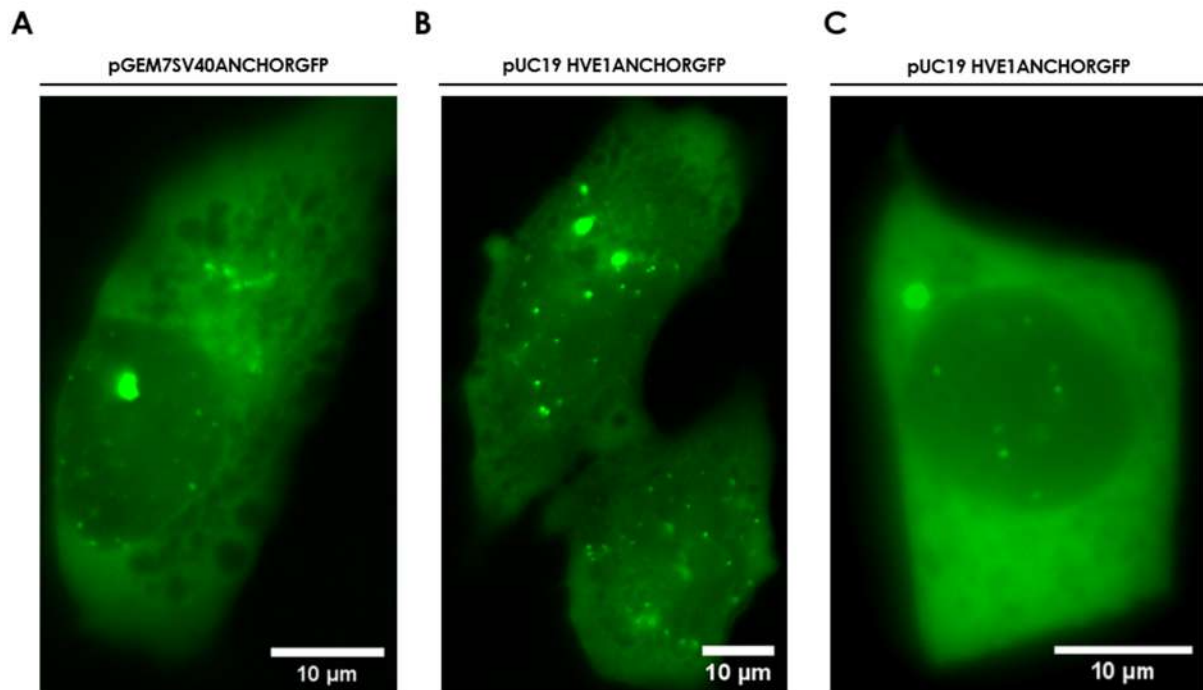


Figure 50. Vérification de l'expression du système ANCHOR™ par pUC19HVE1ANCHORGFP

A.B Cellules HeLa transfectées avec le plasmide pGEM7SV40ANCHORGFP (A) ou le plasmide pUC19HVE1ANCHORGFP (B). C. RK13 transfectées avec pUC19HVE1ANCHORGFP. Acquisition réalisée 48h post-transfection avec le Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2, objectif 63x. Barre d'échelle = 10 µm.

Dans les cellules HeLa, le signal obtenu par la transfection du plasmide pUC19HVE1ANCHORGFP est identique à celui obtenu avec le contrôle positif pGEM7SV40ANCHORGFP, confirmant la bonne fonctionnalité de la cassette auto-fluorescente. De plus, la transfection du plasmide de transfert dans les cellules RK13 induit un signal ponctiforme identique, démontrant que ces cellules peuvent bien être transfectées par pUC19HVE1ANCHORGFP et confirmant que les cellules RK13 peuvent être utilisées pour la recombinaison homologue.

III.2 Recombinaison homologue

Afin d'insérer la technologie ANCHOR™ dans le génome de l'herpèsvirus équin de type 1, une expérience de recombinaison homologue a été réalisée (Figure 51).

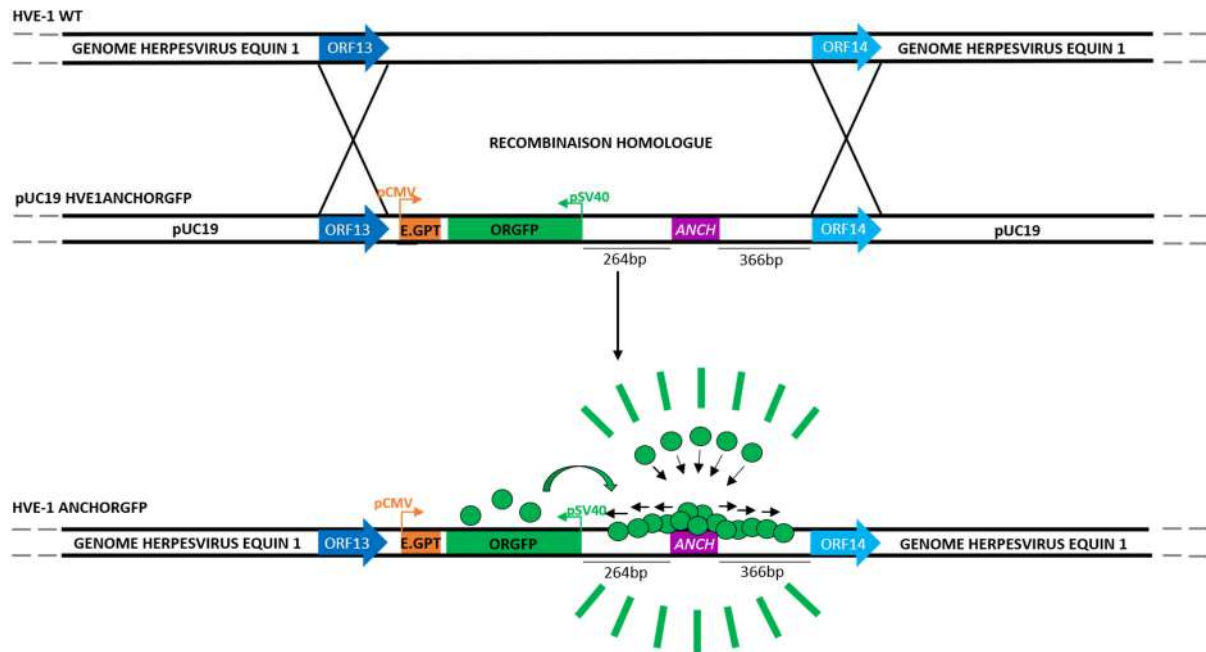


Figure 51. Représentation schématique de la recombinaison homologue.

La recombinaison homologue est un mécanisme permettant d'échanger un fragment d'ADN entre deux génomes, grâce à des séquences communes identiques. Ici, la mise en contact de HVE-1 et du plasmide pUC19HVE1ANCHORGFP, possédant tous les deux les gènes ORF13 et ORF14, a permis d'insérer le fragment d'intérêt contenant le système ANCHOR™ et le gène de sélection *eco.gpt* dans le génome de l'herpèsvirus équin de type 1 afin d'obtenir l'HVE-1 ANCHORGFP.

Malheureusement, la construction du plasmide de transfert et l'obtention de l'HVE-1 recombinant ANCHORGFP a duré près de deux ans, à cause de différents problèmes techniques lors de certains clonages et de la recombinaison homologue.

En effet, les premières expériences de recombinaison homologue ont été réalisées sous pression de sélection xanthine/ hypoxanthine/ acide mycophénolique. Cependant, la souche d'herpèsvirus équin utilisée dans cette thèse s'est révélée être résistante à cette sélection et aucun recombinant n'a pu être obtenu dans ces conditions expérimentales.

Après échec de la sélection, les expériences de recombinaison ont été poursuivies dans les mêmes conditions, sans sélection, en effectuant l'infection et la transfection dans des boîtes de pétri de 100mm². Cependant, tous ces essais sont restés infructueux, tout comme ceux réalisés en plaques 6 puits.

Finalement, pour augmenter les chances d'obtenir un virus recombinant, l'infection et la transfection des cellules ont été réalisées en plaque P96. Les cellules RK13 ont ainsi été infectées avec différentes concentrations de particules virales d'HVE-1 WT et toutes transfectées avec 100ng de pUC19HVE1ANCHORGFP. Lorsque l'ECP fut total, le surnageant de chaque puits a été récupéré et a été utilisé pour infecter de nouvelles cellules.

Afin de visualiser la formation de plages fluorescentes correspondant au virus HVE-1 ANCHORGFP recombinant, les cellules ont été observées tous les jours au microscope à fluorescence. Sur l'ensemble des conditions, une seule petite plage regroupant une dizaine de cellules fluorescentes a pu être observée dans l'un des puits infectés avec du surnageant de la condition 20 particules (Figure 52).

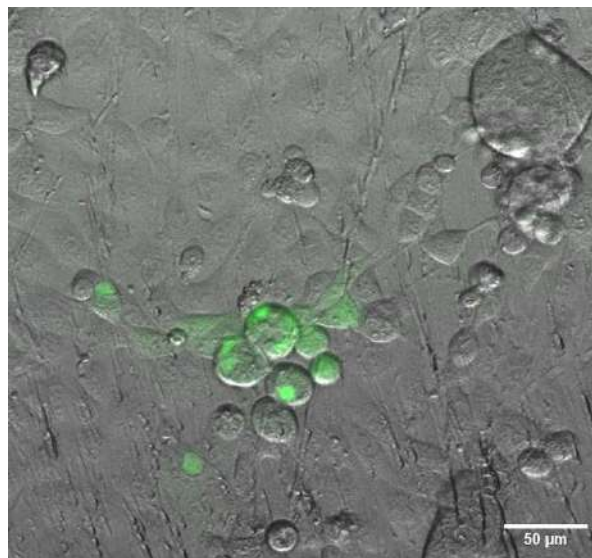


Figure 52. Plage fluorescente obtenue après recombinaison homologue entre le plasmide pUC19HVE1ANCHORGFP et HVE-1 WT

Image prise avec le Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2, objectif 63x, 24h après infection avec 15µL de surnageant de recombinaison. Barre d'échelle = 50 µm.

III.3 Purification de l'HVE-1 ANCHORGFP

Pour éviter une trop forte concentration de HVE-1 parental non marqué (WT), la plaque fluorescente a été repiquée manuellement après retrait du milieu de culture et a été utilisée pour infecter de nouvelles cellules RK13.

Vingt-quatre heures après infection, des cellules fluorescentes peuvent être observées, confirmant que la plaque fluorescente isolée correspond bien à un virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP (Figure 53).

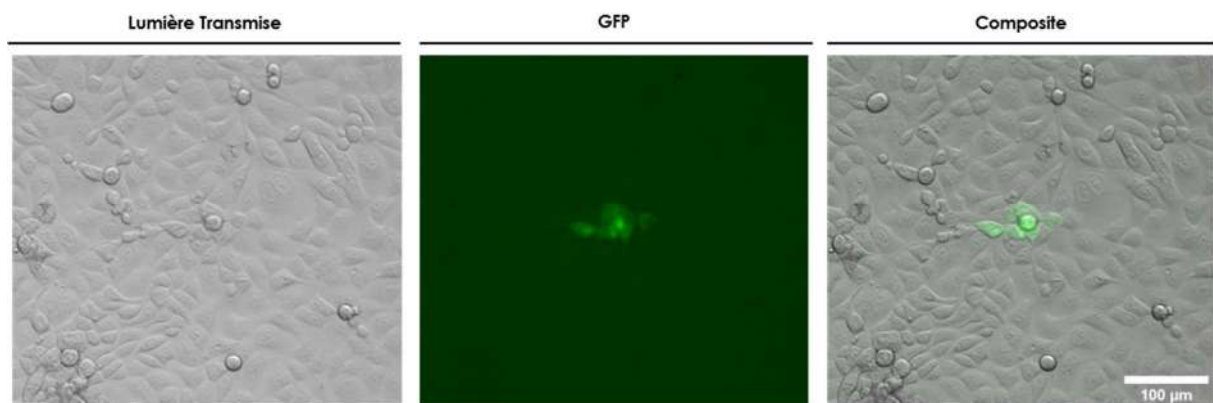


Figure 53. Premier passage de purification, 24h post infection.

Cellules RK13 infectées avec la plaque fluorescente HVE-1 ANCHORGFP repiquée. L'acquisition a été réalisée avec Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2, objectif 63x, 24h post-infection.

Barre d'échelle = 100 µm

Quarante-huit heures après infection, plusieurs plages fluorescentes de taille plus importante peuvent être visualisées, signifiant que le virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP s'amplifie petit à petit (Figure 54), même si à ce stade de purification, il reste grandement contaminé par du virus sauvage.

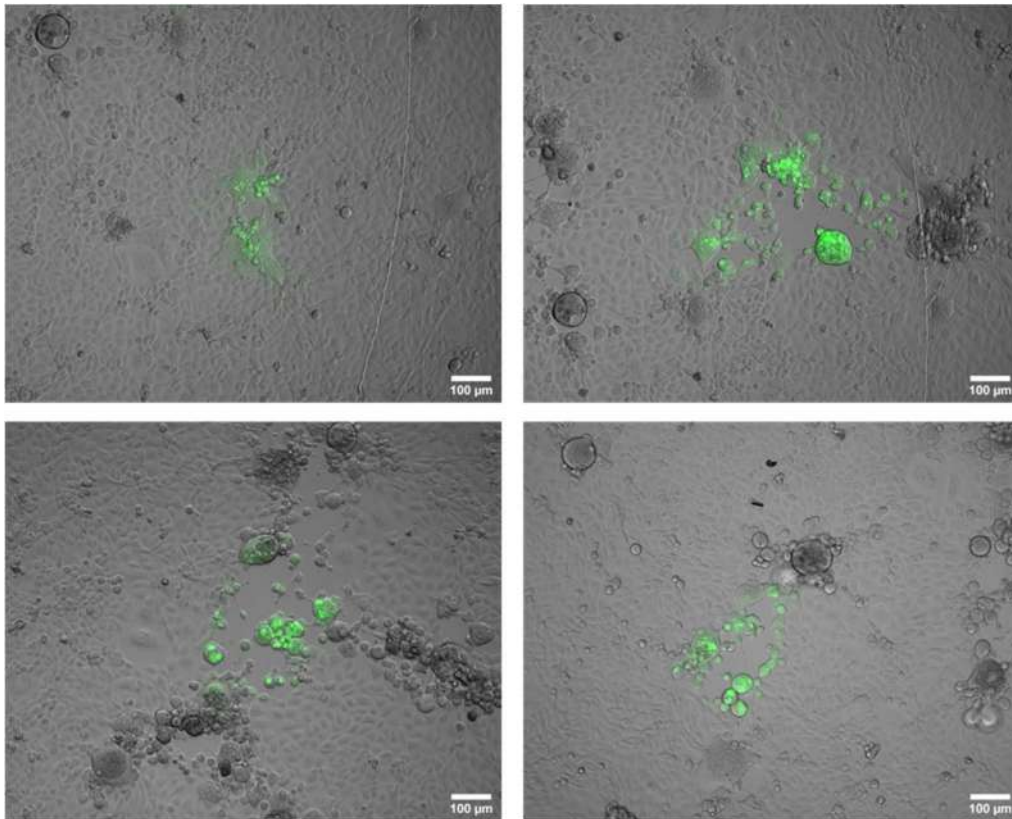


Figure 54. Plages d'HVE-1 ANCHORGFP 48h post-infection

Cellules RK13 infectées avec la plaque fluorescente HVE-1 ANCHORGFP repiquée, 48h post-infection. L'acquisition a été réalisée avec Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2, objectif 63x.

Barre d'échelle = 100 μm

Certaines de ces plages ont ensuite été repiquées comme décrit précédemment afin d'isoler au mieux le virus recombinant et limiter la proportion d'HVE-1 WT. Cette étape a ensuite été répétée deux autres fois pour concentrer au maximum le virus HVE-1 ANCHORGFP.

Sur la figure 55, correspondant au quatrième passage de purification, nous pouvons ainsi observer une forte concentration de cellules et de plages GFP positives correspondant à HVE-1 ANCHORGFP, confirmant que ces étapes de purification ont permis de concentrer le virus recombinant auto-fluorescent et de réduire la proportion d'HVE-1 WT non marqué. De plus, aucune perte de concentration en virus fluorescent n'a été observée au cours des passages, soulignant le fait que le virus recombinant généré est relativement stable.

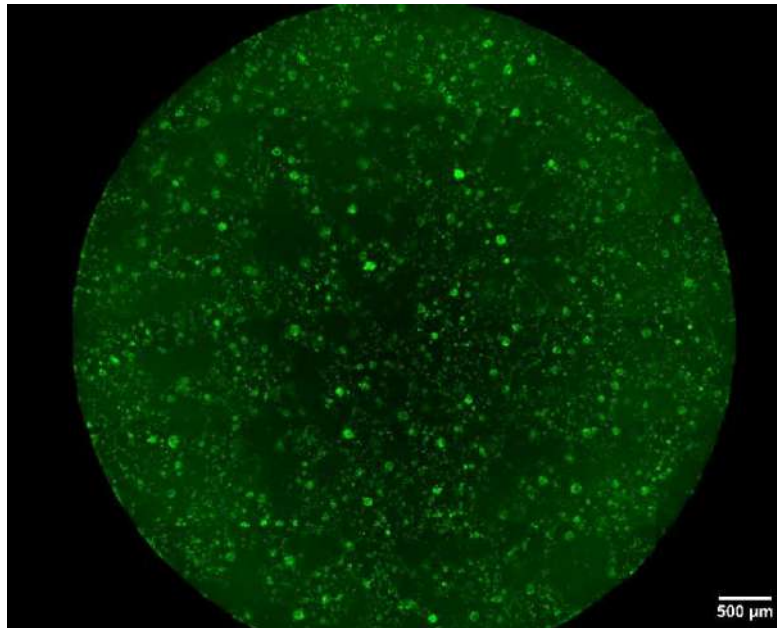


Figure 55. HVE-1 ANCHORGFP obtenu après 4 étapes de purification.

Cellules RK13 infectées avec le 4^{ème} passage d'HVE-1 ANCHORGFP. L'acquisition d'un puits en entier a été réalisée avec Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2, objectif 10x, 48h post-infection et correspond à la reconstruction d'une image de 36 champs. Barre d'échelle = 500 μm

Suite à ces étapes et avant de produire un stock viral conséquent, la pureté du virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP a été déterminée. Pour cela, une pré-production de stock viral a été réalisée par l'infection de cellules RK13 avec une seule plaque issue du quatrième passage de purification.

Des cellules RK13 ont ensuite été infectées avec des dilutions en triplicat de cette pré-production et observées quotidiennement au microscope à fluorescence. Après deux jours d'infection, les plaques de lyse de la dilution 10^{-3} ont été comptées manuellement. Le rapport du nombre de plaques fluorescentes sur celui du nombre total de plaques a été calculé et a permis de déterminer le pourcentage de pureté d'HVE-1 ANCHORGFP à environ 97% (Tableau 14).

	Nombre de plaques GFP positives	Nombre total de plaques	Pureté
Puits 1	218	220	99,09 %
Puits 2	186	196	94,90 %
Puits 3	167	174	95,98 %
Moyenne	571	590	96,78 %

Tableau 14. Pureté d'HVE-1 ANCHORGFP.

Sachant qu'il est difficile d'atteindre une pureté de 100% sans l'utilisation d'une pression de sélection, et que HVE-1 ANCHORGFP représente 97% de la population virale observée, nous avons décidé de ne pas faire d'autres cycles de purification et de produire notre stock d'HVE-1 ANCHORGFP à partir de cette pré-production. De plus, nous ne pouvons pas exclure que la faible proportion de plages non fluorescentes soit le résultat d'évènements aléatoires tels que des mutations ponctuelles de la GFP.

III.4 Caractérisation de l'HVE-1 ANCHORGFP

III.4.1 Vérification du site de recombinaison

Après production, le site d'insertion du système ANCHOR™ dans le génome d'HVE-1 ANCHORGFP a été confirmé par différentes PCRs.

Premièrement, afin de vérifier que la recombinaison n'a pas eu lieu à l'intérieur des gènes ORF13 ou ORF14, les PCRs correspondantes ont été réalisées comme décrit dans le tableau 11 (Figure 56).

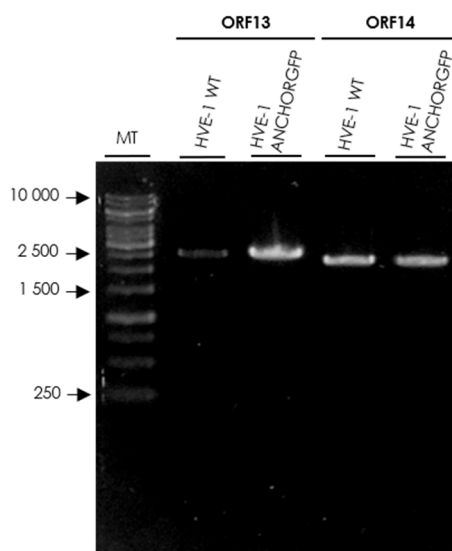


Figure 56. Gel d'électrophorèse des PCRs ORF13 et ORF14.

Les PCRs ORF13 et ORF14 ont été réalisées sur l'ADN d'HVE-1 WT ou HVE-1 ANCHORGFP. MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder Fermentas.

Pour chacune des PCRs, le signal obtenu est identique à celui du contrôle positif HVE-1 WT non marqué, avec des fragments d'ADN de taille respective de 2 694 nt et de 2 422 nt signifiant que les gènes ORF13 et ORF14 n'ont pas été modifiés lors de la recombinaison.

Une deuxième PCR a ensuite été réalisée afin de vérifier que la région intergénique entre ORF13 et ORF14 correspond bien au site de recombinaison. Pour cela, l'amorce sens ORF13 et l'amorce anti-sens ORF14 ont été utilisées ensemble selon le protocole décrit dans le tableau 13 pour amplifier la séquence d'ADN correspondant aux gènes ORF13, ORF14 et leur région intergénique (Figure 57).

La séquence d'intérêt comprenant le gène *eco.gpt* sous la dépendance de pCMV et le système ANCHOR™ mesurant 5 541 nt, un amplicon de 10 563 nucléotides est attendu.

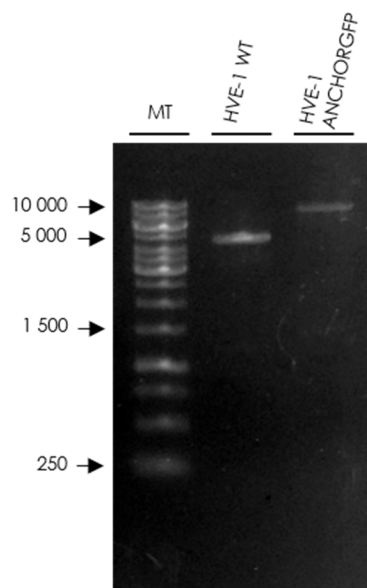


Figure 57. Gel d'électrophorèse de la PCR ORF13/ORF14.

MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder Fermentas.

Nous pouvons observer que l'amplicon obtenu à partir du virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP présente une bande d'environ 10 000 nt, bien supérieure à celle observée pour HVE-1 WT (5 000 nt), ce qui confirme que la région intergénique entre ORF13 et ORF14 est bien le site de la recombinaison.

Cependant, afin de vérifier que le fragment d'ADN inséré dans cette région intergénique contient bien la cassette auto-fluorescente, une PCR ANCHORGFP a été réalisée sur le produit PCR de 10 563 nt décrit précédemment (Figure 58).

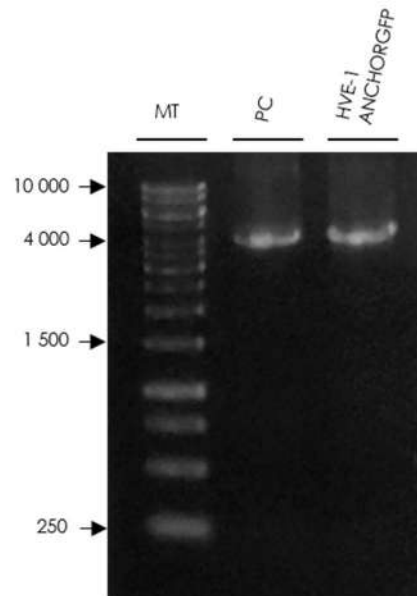


Figure 58. Gel d'électrophorèse de la PCR ANCHORGFP.

PC : plasmide contrôle correspondant à pUC19HVE1ANCHORGFP. MT : marqueur de taille GeneRuler 1kb DNA ladder Fermentas.

Un signal d'environ 4 000 nt, identique à celui du contrôle pUC19HVE1ANCHORGFP, est obtenu pour HVE-1 ANCHORGFP, démontrant que le système ANCHOR™ a bien été inséré dans la région intergénique entre ORF13 et ORF14.

Par la suite, les caractéristiques *in vitro* de l'HVE-1 ANCHORGFP ont été étudiées afin de vérifier si l'insertion du fragment d'intérêt entre les gènes ORF13 et ORF14 a pu les altérer.

III.4.2 Propriétés biologiques d'HVE-1 ANCHORGFP

Tout d'abord, des cellules RK13 ont été infectées à faible MOI (0,008) avec HVE-1 WT non marqué ou HVE-1 ANCHORGFP et l'effet cytopathique a été observé quotidiennement au microscope à fluorescence (Figure 59).

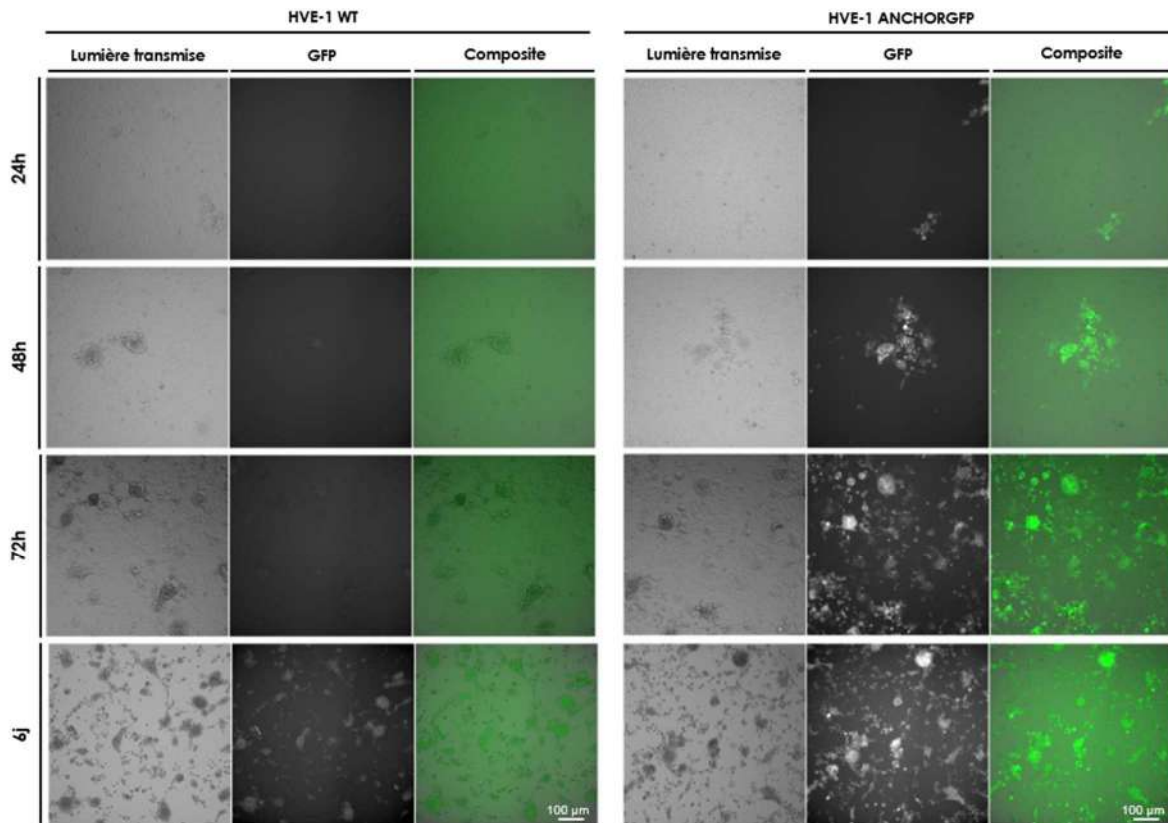


Figure 59. Comparaison de l'effet cytopathique d'HVE-1 WT et HVE-1 ANCHORGFP.

Qu'il s'agisse d'HVE-WT ou d'HVE-1 ANCHORGFP, l'effet cytopathique apparaît dès le lendemain de l'infection avec la formation de quelques plages et croît de manière exponentielle jusqu'à la destruction totale du tapis cellulaire après six jours d'infection. L'insertion du système ANCHOR™ entre les gènes ORF13 et ORF14 ne semble donc pas avoir modifié les capacités d'infection et de production du virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP.

Afin de confirmer ce résultat, une cinétique d'infection a également été réalisée (Figure 60).

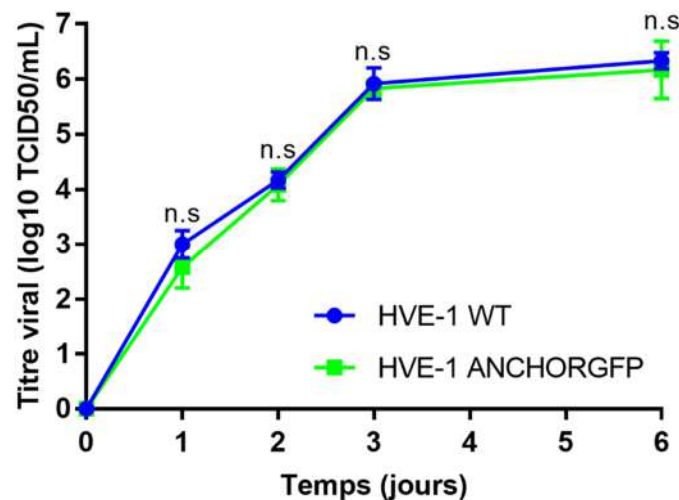


Figure 60. Comparaison du titre viral d'HVE-1 WT et HVE-1 ANCHORGFP.

Le graphique correspond à la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes et représente le titre viral exprimé en TCID50/mL (échelle logarithmique). La lecture des résultats a été réalisée 72h post-infection. Les statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism 7 à l'aide d'un test de student non apparié. n.s : non significatif.

Pour les deux virus, les titres viraux obtenus sont similaires tout au long de la cinétique, confirmant que production d'HVE-1 ANCHORGFP atteint un niveau équivalent à celui de la souche parentale et que les propriétés biologiques du virus recombinant n'ont pas été modifiées par la recombinaison, l'insertion de la technologie ANCHOR™ ou les passages successifs sur cellules RK13.

III.4.3 Cinétique de réplication de l'HVE-1 ANCHORGFP

Bien que les productions d'HVE-1 ANCHORGFP et de HVE-1 WT soient similaires, une étude cinétique comparée a également été réalisée afin de vérifier que l'insertion de la cassette auto-fluorescente et des éléments associés ne perturbe pas la réplication virale.

Pour cela, des cellules RK13 ont été infectées avec le virus parental ou le virus recombinant à une MOI 0,008 et l'ADN viral de chaque condition a été extrait 24h, 48, 72h et 6j post-infection puis quantifié par qPCR (Figure 61).

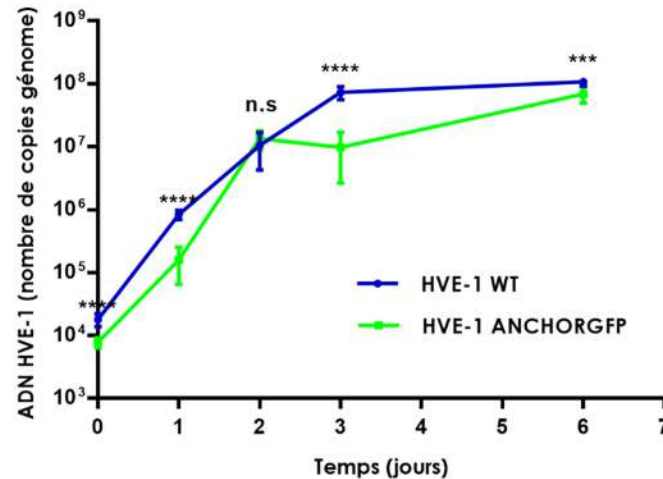


Figure 61. Cinétique de réplication virale d'HVE-1 WT et HVE-1 ANCHORGFP

Le graphique correspond à la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes et représente la charge virale exprimée en nombre de copies génomes. Pour chaque expérience indépendante, la quantification par qPCR a été effectuée en triplicat. Le temps 0, correspond à la quantification de l'inoculum d'infection. Les statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism 7 à l'aide d'un test de student non apparié. n.s : non significatif. ***: p-value = 0.0004. ****: p-value < 0.0001.

HVE-1 WT présente une courbe de réplication en deux temps, avec une augmentation exponentielle de la réplication durant les trois premiers jours, et une phase plus lente avec l'apparition d'un plateau les jours suivants. HVE-1 ANCHORGFP présente une courbe parallèle avec une cinétique quasi-identique les deux premiers jours et atteint un niveau de réplication équivalent à celui de HVE-1 WT au sixième jour, pouvant signifier que l'insertion du système ANCHOR™ n'induit pas de défaut majeur de la réplication virale. Cependant, des valeurs plus faibles sont obtenues pour HVE-1 ANCHORGFP dès la quantification de l'inoculum à T0 dont l'origine n'a pas encore été déterminée. Cette différence est par contre maintenue pour la plupart des points mais ne semble pas être due à un défaut de la réplication virale puisque le niveau de réplication d'HVE-1 ANCHORGFP au bout de 6j est similaire à celui de la souche parentale et que la différence significative tend à diminuer.

III.5 HVE-1 ANCHORGFP pour l'étude de l'infection et de la réplication virale

Après avoir vérifié que HVE-1 ANCHORGFP avait conservé ses propriétés biologiques et ses capacités de réplication, une étude en temps réel de son cycle de réplication a été réalisée. Pour cela, des cellules RK13 ont étéensemencées sur une boîte de culture 35mm à fond en

verre pour la microscopie puis infectées avec HVE-1 ANCHORGFP et observées quotidiennement au microscope à fluorescence (Figure 62).

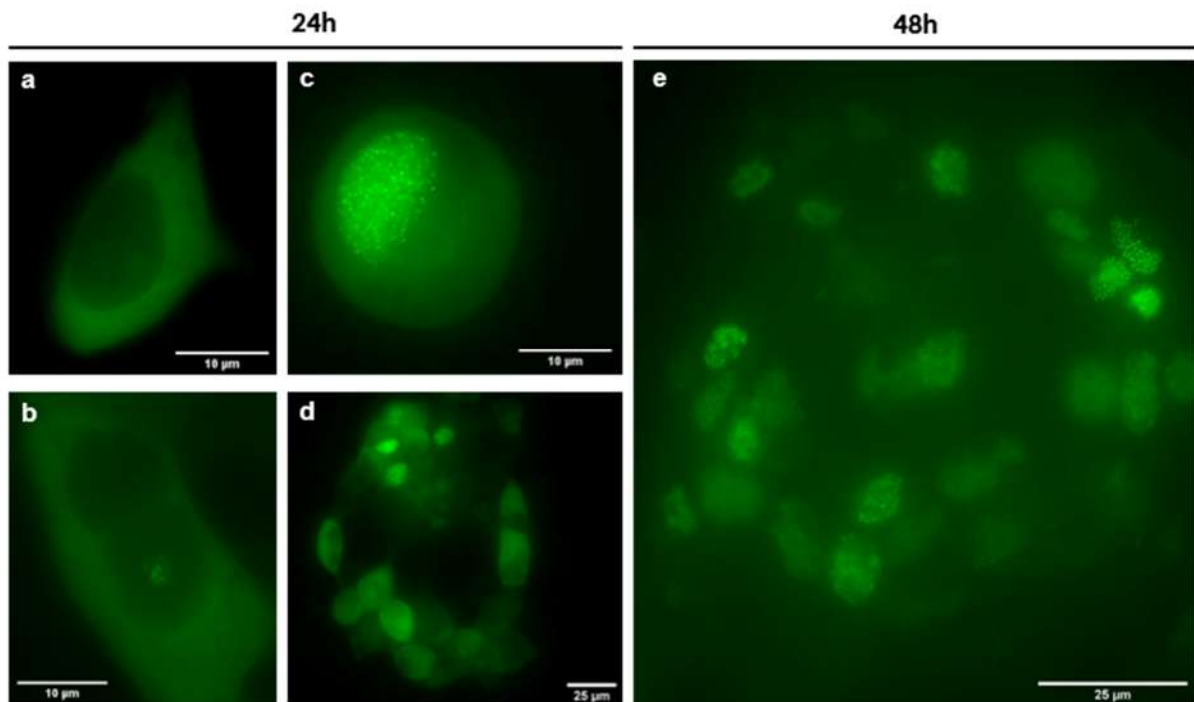


Figure 62. Suivi de l'infection et de la réplication d'HVE-1 ANCHORGFP dans des RK13.

Des cellules RK13 ont été infectées avec HVE-1 ANCHORGFP à MOI 0,25 et imagées à 24h et 48h post-infection avec le Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2 microscope, objectif 63x.

a. L'expression des protéines ORGFP entraîne l'apparition d'un signal GFP diffus dans le cytoplasme des cellules infectées. Barre d'échelle = 10 µm. b. Formation d'un centre répliatif précoce. Barre d'échelle = 10 µm. c. Cellule présentant un large centre répliatif. Barre d'échelle = 10 µm. d. Syncytium en cours de formation. Barre d'échelle = 25 µm. e. Cellule géante (syncytium) regroupant de nombreuses cellules infectées et plusieurs centres répliatifs. Barre d'échelle = 25 µm.

A 24h, l'infection n'est pas encore prononcée et des cellules de phénotypes différents peuvent être visualisées. Tout d'abord nous pouvons observer des cellules présentant un signal GFP diffus dans le cytoplasme (a). Ce signal correspond à l'expression des protéines ORGFP suite à l'entrée des particules d'HVE-1 ANCHORGFP. L'absence de signal nucléaire, ou un signal nucléaire faible, indique qu'il s'agit de cellules en début de cycle, chez lesquelles la réplication du génome n'est pas encore assez importante pour observer la formation des spots fluorescents. Dans certaines cellules, quelques spots fluorescents, correspondant à des molécules d'ADN viral, apparaissent dans le noyau des cellules infectées et s'organisent dans des structures circulaires s'appariant à des centres répliatifs précoces (b). Ensuite, nous pouvons observer

des cellules dont le noyau contient un nombre très important de spots fluorescents, et donc de génomes viraux, regroupés au sein d'un large centre répliatif (c).

Enfin, des petits regroupements de cellules à des stades différents d'infection sont également visualisés et correspondent à des syncytia en formation, c'est-à-dire à la fusion de plusieurs cellules (d).

A 48h, l'infection est désormais bien prononcée. La majorité des cellules sont infectées, et la plupart d'entre elles ont fusionné afin de former une cellule géante, aussi appelée syncytium (e). De plus, nous pouvons voir que la majorité des cellules incluses dans ce syncytium présente un large centre répliatif, supposant ainsi que la formation des syncytia est concomitante ou se déroule après la réplication de l'ADN viral et que cette dernière se poursuit après la fusion des cellules entre elles.

Afin de confirmer que ce type de syncytium correspond bien à une cellule géante unique, les cellules ont été fixées 48h post-infection, et un marquage de la phalloïdine, toxine pouvant se lier aux filaments d'actine a été réalisé (Figure 63).

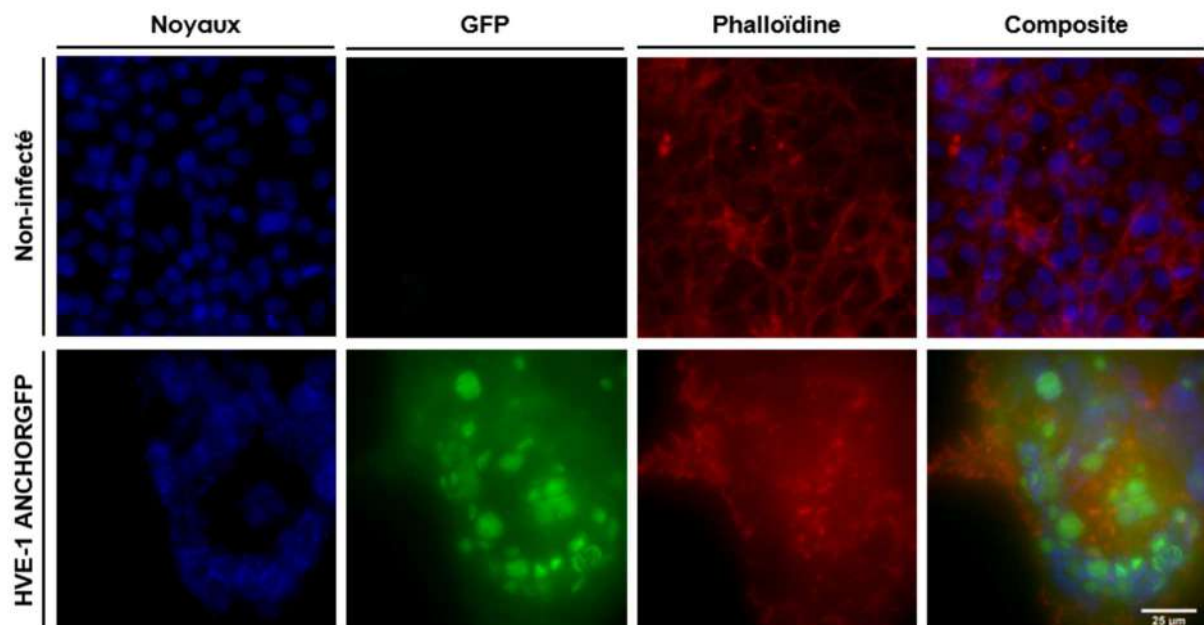


Figure 63. Structure de l'actine filamentaire dans des cellules RK13 infectées par HVE-1 ANCHORGFP.

Les images ont été prises avec le microscope Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2, objectif 63x, 48h post-infection. GFP : signal HVE-1 ANCHORGFP. Phalloïdine : filaments d'actine. Barre d'échelle = 25 µm.

Lorsque les cellules ne sont pas infectées, le réseau d'actine est bien défini ; les filaments formant une frontière entre les cellules et représentant sûrement des complexes sous-corticaux. En revanche, dans les cellules RK13 infectées par HVE-1 ANCHORGFP, le réseau de filaments d'actine est totalement réarrangé. Lors de la fusion des cellules et la formation du syncytium, les réseaux d'actine propres à chaque cellule ont également fusionné entre eux afin de former un réseau de filaments d'actine unique. Ce réseau semble entourer le syncytium ainsi que ses projections, confirmant que la structure observée correspond bien à une cellule unique géante multinucléée.

Après avoir observé l'infection et la réplication d'HVE-1 ANCHORGFP en direct dans les cellules RK13, des cellules ED ont également été infectées avec l'HVE-1 auto-fluorescent afin de vérifier que ce dernier a conservé son tropisme pour les cellules équines et observer si il présente un cycle de réplication similaire (Figure 64).

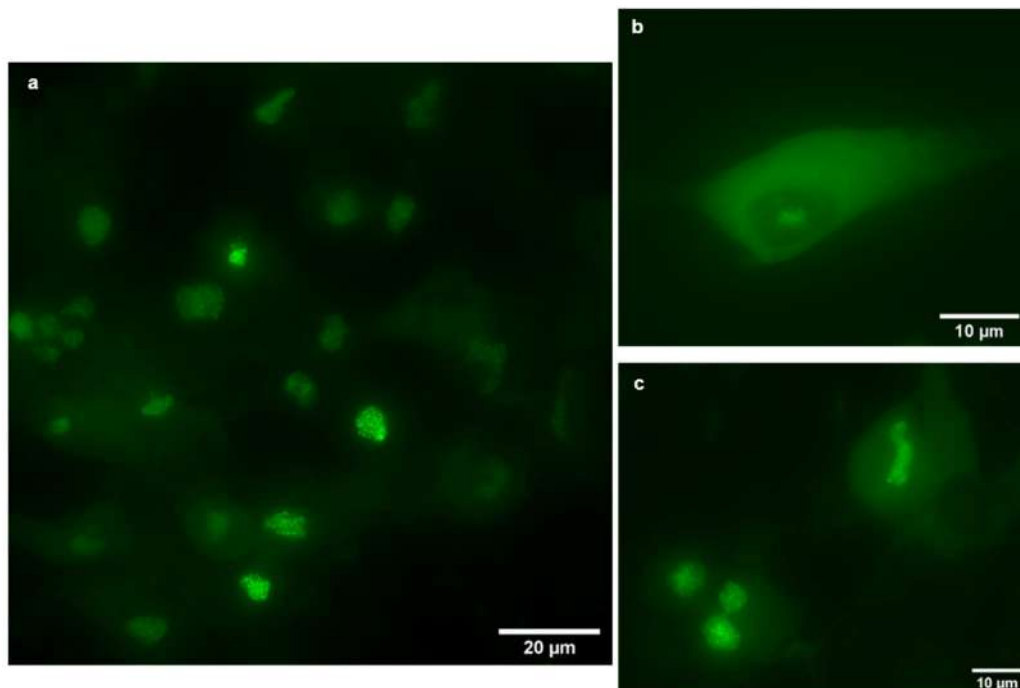


Figure 64. Infection et réplication d'HVE-1 ANCHORGFP dans les cellules ED.

Des cellules ED ont été infectées avec HVE-1 ANCHORGFP à MOI 20 et imagées à 24h post-infection avec le Zeiss Axio Observer Z1, Apotome 2 microscope, objectif 63x.

a. Vue d'ensemble des cellules infectées. Barre d'échelle = 20 μm . b. Centre réplcatif en formation. Barre d'échelle = 10 μm . c. Cellules présentant un niveau de réplication élevé avec de larges centres réplcatifs. Barre d'échelle = 10 μm .

L'infection dans les cellules ED est très prononcée avec de nombreuses cellules infectées présentant de larges centres réplicatifs (Figure 64 a-c), confirmant que HVE-1 ANCHORGFP a conservé son tropisme et est toujours capable d'infecter les cellules ED. Même si elles sont minoritaires, des cellules en début d'infection (c) et avec des centres réplicatifs précoces (b) sont également observées, démontrant que l'infection dans les cellules ED est similaire à celle des RK13.

Ainsi, l'utilisation d'HVE-1 ANCHORGFP pour l'étude du cycle viral en temps réel a permis d'apporter de nouvelles précisions concernant la réplication et la formation des syncytia d'HVE-1 dans les cellules RK13, et a également permis de démontrer que les étapes de réplication d'HVE-1 semblent identiques quelle que soit la lignée cellulaire utilisée, avec accumulation des molécules d'ADN viral dans de larges centres réplicatifs.

III.6 HVE-1 ANCHORGFP pour l'identification de nouvelles molécules antivirales

Nous venons de démontrer que l'herpèsvirus équin auto-fluorescent HVE-1 ANCHORGFP est un outil très intéressant pour une meilleure compréhension de l'ensemble des mécanismes virologiques.

Cependant, afin de pouvoir l'utiliser lors d'une campagne de criblage à haut contenu et d'identifier de nouvelles molécules antivirales, il est nécessaire de mettre en place un système de quantification robuste et efficace et de le tester dans les conditions réelles du criblage.

III.6.1 Algorithme de quantification

Pour la quantification d'HVE-1 ANCHORGFP, un algorithme de quantification adapté depuis la bio-application de type « *spot detector* » du CellInsight Cx7 a été utilisé.

Tout d'abord, grâce à un marquage nucléaire fluorescent, les différents noyaux sont isolés par une étape de détection et de segmentation fondée sur la différence d'intensité de fluorescence entre les noyaux cellulaires et le fond de l'image. Ensuite, afin de ne détecter que les éléments correspondant aux noyaux cellulaires, un seuil de restriction basé sur l'aire des objets est appliqué afin d'éliminer les débris cellulaires et les objets de petite taille. Pour que les objets en bordure de champs ne soient pas quantifiés deux fois, les éléments présents à la jonction de deux champs sont également rejetés (Figure 65).

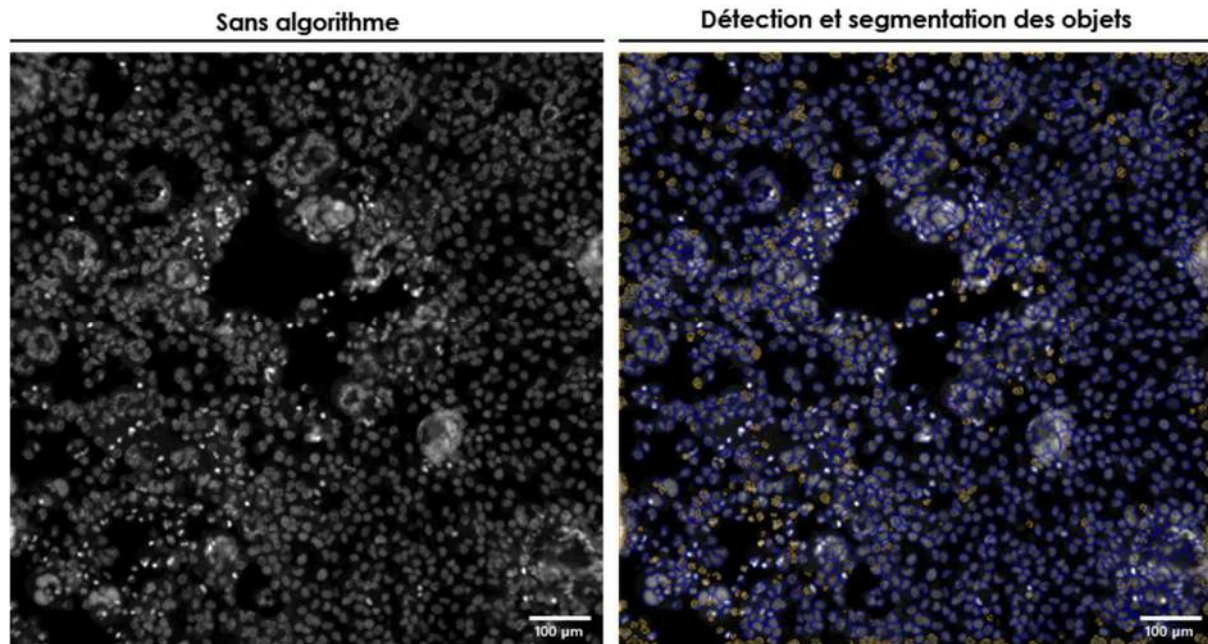


Figure 65. Détection et segmentation des objets.

Gauche : image sans algorithme de détection et de sélection des cellules. Droite : algorithme de détection et de segmentation des objets (bleu). Bleu : objets sélectionnés. Orange : objets rejetés. Les images représentent un seul champ d'acquisition et ont été prises avec le CX7, objectif 10x. Barre d'échelle = 100 μm .

Une fois les noyaux délimités, l'algorithme se fonde sur le signal fluorescent pour identifier les cellules GFP positives (GFP+), correspondant aux cellules infectées par HVE-1 ANCHORGFP (Figure 66, lignes vertes) ; tandis que les cellules GFP négatives sont rejetées et par conséquent exclues de la quantification.

A l'intérieur des cellules GFP+ sélectionnées, l'algorithme détecte ensuite chacun des spots fluorescents, correspondant à l'ADN viral (Figure 66, violet) et quantifie leur intensité totale de fluorescence. Lorsque la réplication est avancée, et que de larges centres réplicatifs sont présents dans les cellules infectées, l'algorithme affiche un seul spot grande taille mais quantifie toujours l'intensité totale de fluorescence de l'ensemble des spots du centre réplicatif.

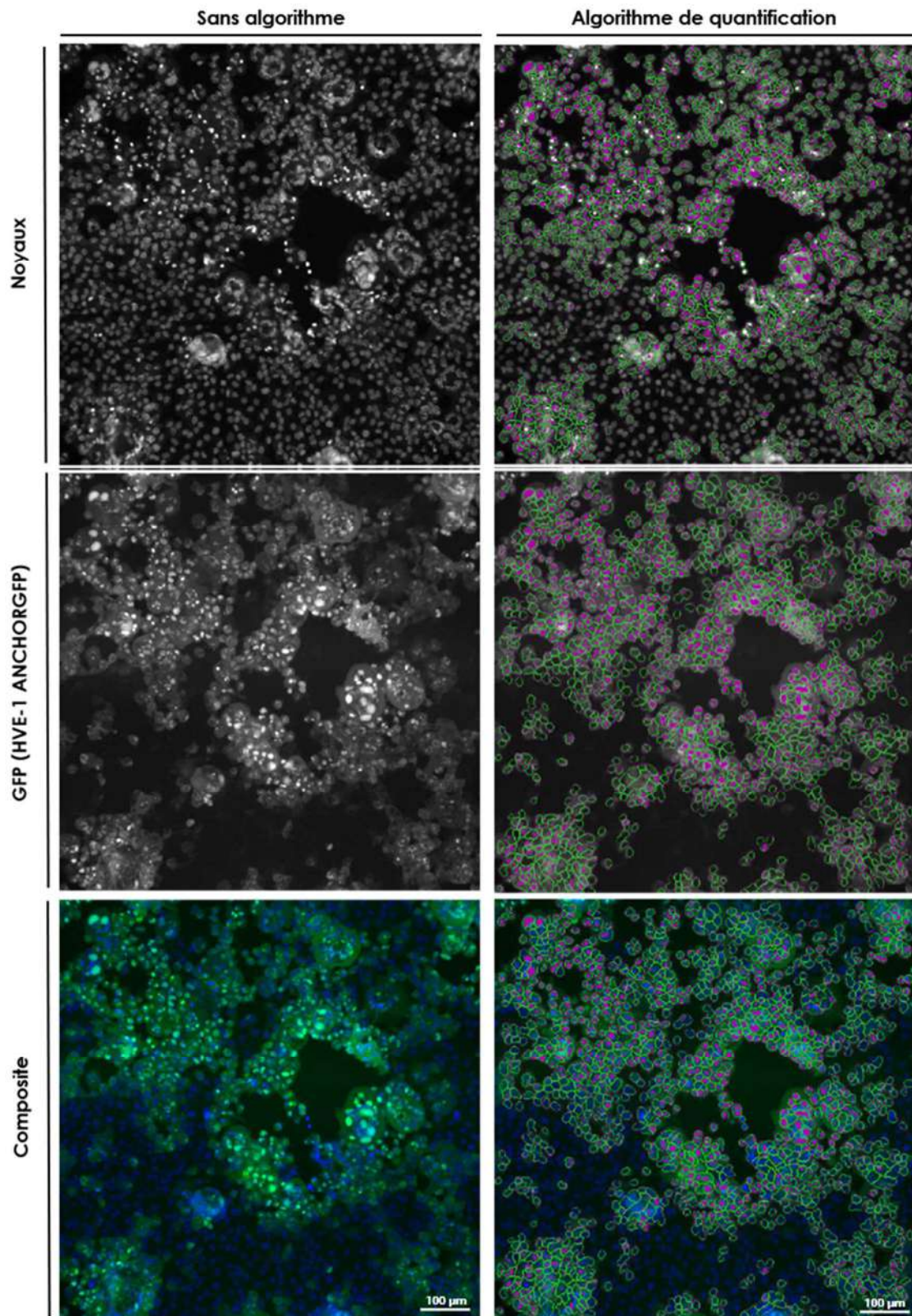


Figure 66. Algorithme de quantification d'HVE-1 ANCHORGFP.

Cellules RK13 traitées avec 0,5% DMSO et infectées avec HVE-1 ANCHORGFP à MOI 1, sans (gauche) ou avec algorithme de quantification (droite). Lignes vertes : sélection des cellules GFP positives (cellules infectées). Violet : quantification des spots fluorescents (centres répliatifs). L'acquisition a été réalisée au CX7, objectif 10x. Un seul champ est représenté. Barre d'échelle = 100 µm.

Ainsi, cette quantification effectue une analyse multiparamétrique permettant d'obtenir plusieurs données simultanément.

Tout d'abord, par la détection et la délimitation des noyaux cellulaires, cet algorithme permet de quantifier le nombre total de cellules et donc de déterminer une potentielle cytotoxicité des composés testés.

Ensuite, par la quantification des cellules GFP+, le nombre de cellules infectées est déterminé et l'algorithme calcule automatiquement le rapport du nombre de cellules GFP+ sur le nombre total de cellules détectées, permettant ainsi d'obtenir le taux d'infection.

Enfin, la quantification de l'intensité totale des spots fluorescents, qui augmente parallèlement à la réplication de l'ADN viral, permet de déterminer le taux de réplication d'HVE-1 ANCHORGFP.

III.6.2 Application d'HVE-1 ANCHORGFP pour le HCS

Après la mise au point de l'algorithme de quantification, une expérience a été réalisée dans les conditions identiques au protocole de criblage afin de définir si cette méthode de quantification est suffisamment robuste pour être appliquée lors de campagnes de HCS.

Pour cela, des cellules RK13 ont été traitées avec une des seize plaques de la banque fille Prestwick Chemical 0,4mM. Ces 80 composés, dont le ganciclovir, ont été testés à une concentration finale de 2 μ M dans 0,5% DMSO. Après traitement, les cellules ont été infectées avec HVE-1 ANCHORGFP à MOI 1 et incubées à 37°C avec 5% CO₂ pendant 48 heures.

Après incubation, les cellules ont été fixées comme décrit précédemment et les noyaux marqués avec 1 μ g/mL de Hoechst.

Suite à la quantification, les données obtenues ont été normalisées sur la moyenne des valeurs obtenues pour les puits contrôles, correspondant aux cellules RK13 traitées avec 0,5% DMSO et infectées avec HVE-1 ANCHORGFP. Dans la suite de ce manuscrit, ces contrôles seront dénommés DMSO.

Les résultats de cette calibration, correspondant à la moyenne de trois expériences indépendantes sont présentés dans la figure 67.

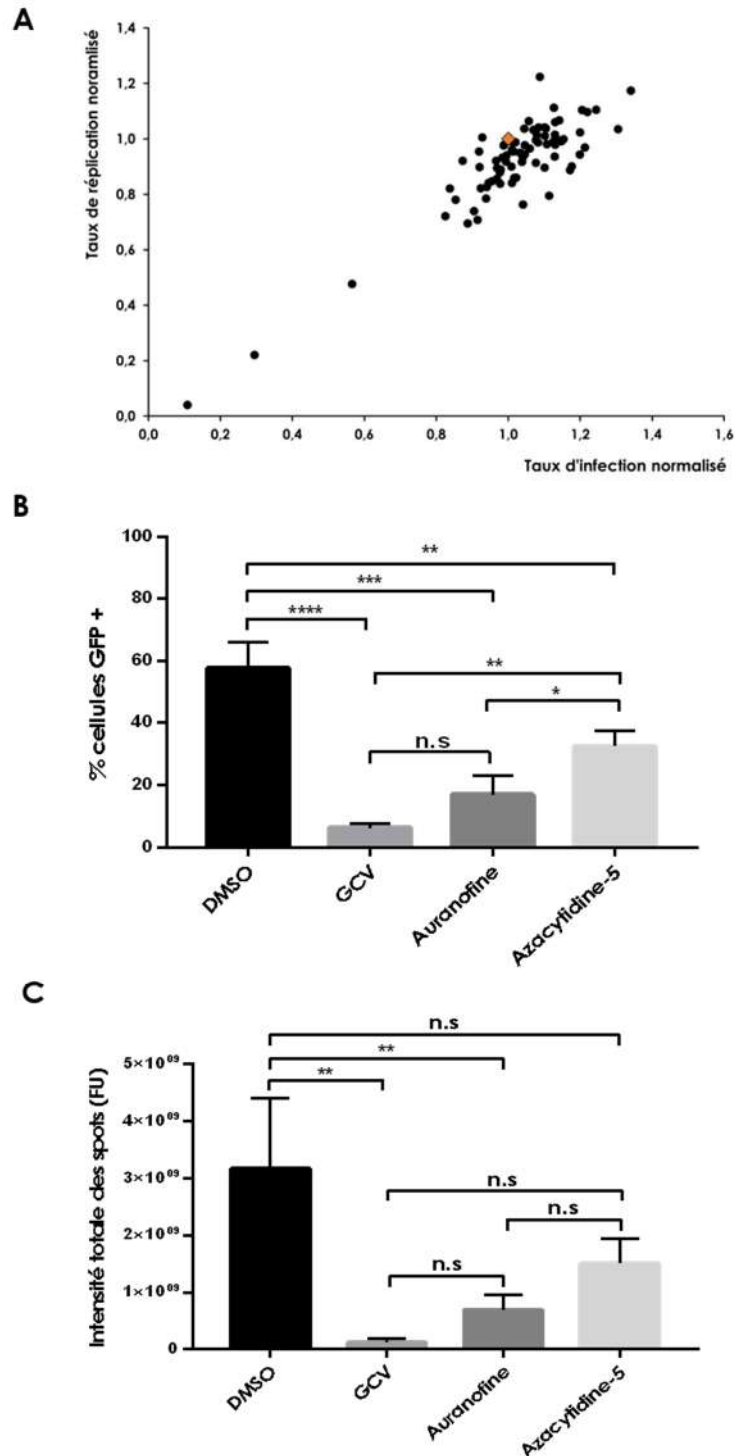


Figure 67. Activité antivirale et cytotoxicité des 80 composés testés contre HVE-1 ANCHORGFP.

A. Activité antivirale. Graphique représentant le taux de réplication normalisé en fonction du taux d'infection normalisé par rapport au contrôle DMSO (losange orange). B. Comparaison de l'activité antivirale des 3 composés identifiés sur le taux d'infection ou le taux de réplication (C). Les graphiques représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graphpad Prism 7 à l'aide d'un test One-way anova et comparaisons multiples. n.s: non significatif. *: p-value < 0,05. **: p-value < 0,008. ***: p-value = 0,0001 ****: p-value < 0.0001. GCV: ganciclovir.

Sur l'ensemble des 80 composés, trois d'entre eux démontrent une forte activité antivirale entraînant une diminution de plus de 50% du taux d'infection et du taux de réplication d'HVE-1 ANCHORGFP (Figure 67A). Parmi ces composés, nous avons identifié le ganciclovir, dont l'action réduit d'environ 90% l'infection et la réplication virale, démontrant que l'utilisation de l'HVE-1 ANCHORGFP et de son algorithme de quantification permettent l'identification de molécules antivirales. Les autres composés correspondent à l'auranofine et à l'azacytidine-5, et induisent respectivement une diminution d'environ 70% et 50% de l'infection et de la réplication d'HVE-1 ANCHORGFP (Figure 67B-C).

En plus des données quantitatives, l'utilisation du virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP permet également d'obtenir des données qualitatives par la visualisation directe de l'effet antiviral des composés, représentée par la diminution du signal de fluorescence (Figure 68).

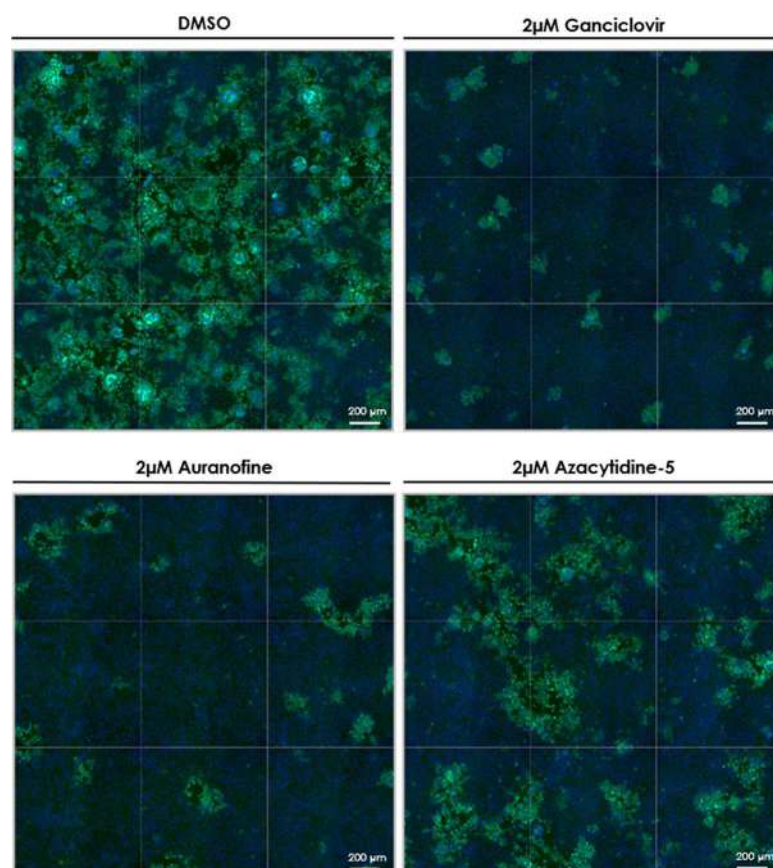


Figure 68. Visualisation de l'activité antivirale du ganciclovir, de l'auranofine et de l'azacytidine-5 contre HVE-1 ANCHORGFP.

Cellules RK13 traitées avec 0,5% DMSO (DMSO) ou 2µM de ganciclovir, auranofine ou azacytidine-5 (0,5% DMSO) et infectées avec HVE-1 ANCHORGFP à MOI 1. Acquisition réalisée au CX7, objectif 10x, 48h après infection. Une reconstruction de 9 champs est représentée. Barre d'échelle = 200 µm.

Afin de déterminer la puissance de l'algorithme de quantification, le Z' factor pour le taux d'infection et le taux de réplication a été déterminé selon la formule de Zhang. Les moyennes et écarts-types des contrôles positifs et négatifs nécessaires à son calcul et le Z' factor associé sont présentés pour deux expériences indépendantes dans le tableau 15.

	Taux d'infection (% cellules GFP+)				Taux de réplication (intensité totale des spots)			
	Expérience 1		Expérience 2		Expérience 1		Expérience 2	
	DMSO	NI	DMSO	NI	DMSO	NI	DMSO	NI
Moyenne	65,40	0,07	48,42	0,01	4581341572	1136673	2570597065	81123
Ecart-type	10,14	0,07	4,94	0,01	674268438	1296594	369308371	162246
Z' factor	0,53		0,69		0,56		0,57	
Moyenne	0,61				0,56			

Tableau 15. Détermination du Z' factor

DMSO : contrôle positif avec un signal maximal. NI : cellules traitées avec 0,5% DMSO mais non infectées, contrôle négatif correspondant au signal minimal (bruit de fond).

Que ce soit pour le taux d'infection ou le taux de réplication, le Z' factor obtenu pour chaque expérience est supérieur à 0,5 avec une moyenne respective de 0,61 et de 0,56 signifiant que l'HVE-1 ANCHORGFP et son algorithme de quantification sont des outils utilisables et très performants pour le criblage à haut contenu et permettant une identification fiable et efficace de molécules antivirales.

III.6.3 Quantification d'HVE-1 en temps réel

Afin d'avoir un temps d'incubation équivalent entre toutes les plaques d'une campagne de criblage à haut contenu, la quantification est réalisée sur des cellules fixées.

Cependant, il est également possible de quantifier l'HVE-1 ANCHORGFP en temps réel sans aucune fixation et ainsi de réaliser des expériences de cinétique (Figure 69).

Pour cela, l'algorithme utilisé est identique à celui décrit précédemment, mis à part que la détection des cellules est directement effectuée sur le signal GFP et non sur le marquage nucléaire. Ainsi, seul le nombre de cellules GFP + est calculé.

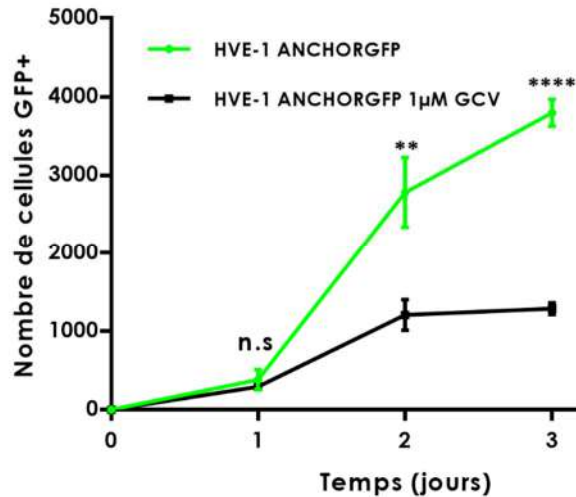


Figure 69. Cinétique de quantification d'HVE-1 ANCHORGFP en temps réel.

Des cellules RK13 ont été traitées (noir) ou non (vert) avec $1\mu\text{M}$ de ganciclovir (GCV) et infectées avec HVE-1 ANCHORGFP à MOI 1. Le nombre de cellules GFP+ a été quantifié quotidiennement à l'aide du CX7. Le graphe représente la moyenne et l'écart-type d'une seule expérience réalisée en triplicats. Les statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism à l'aide d'un test de student non apparié. n.s : non significatif. **: p-value = 0,0049. ****: p-value < 0,0001

Ainsi, nous pouvons observer que le nombre de cellules GFP+, correspondant au nombre de cellules infectées par HVE-1 ANCHORGFP augmente de manière exponentielle au cours du temps, et notamment après 24h d'infection, ce qui est cohérent avec les résultats de la cinétique de répliation réalisée par qPCR auparavant (figure 61 page 135). Lorsque les cellules ont été traitées avec $1\mu\text{M}$ de ganciclovir, le nombre de cellules infectées est beaucoup plus faible et tend à rester constant à partir de 48h après infection, démontrant l'activité antivirale du ganciclovir et confirmant que ce système de quantification est également efficace pour la réalisation de l'étude de composés antiviraux en temps réel sur cellules non fixées.

Par la nécessité de prendre deux fois la même photographie, et donc d'éclairer deux fois les cellules en un laps de temps très court, la quantification du taux de répliation ne peut être réalisée à cause du photoblanchiment.

IV. Discussion

Dans ce chapitre, un herpèsvirus équin auto-fluorescent a été développé par l'insertion du système ANCHOR™ entre les gènes ORF13 et ORF14 d'HVE-1.

Pour cela, une stratégie comprenant 5 étapes de clonage successives a été mise en place afin de former un plasmide comprenant le système ANCHOR™, le gène de sélection *eco.gpt* sous la dépendance du promoteur pCMV et dont les zones d'homologies sont facilement interchangeables et adaptables pour le marquage d'autres virus. Ainsi, il suffit d'amplifier les fragments d'ADN d'intérêt en ajoutant les sites AsiSI / PacI et SwaI/NotI dans les amorces PCR et de les insérer dans le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP pour obtenir rapidement un plasmide de transfert complet permettant le suivi de l'ADN et la sélection des recombinants.

Dans ces travaux, le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP construit à partir de cette stratégie n'a été utilisé que pour l'herpèsvirus équin de type 1 et seul un plasmide de transfert contenant les gènes ORF13 et ORF14 d'HVE-1 a été développé.

Le plasmide de transfert pUC19 HVE1ANCHORGFP obtenu après insertion des gènes ORF13 et ORF14 dans pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP a ensuite été utilisé dans des expériences de recombinaison avec des particules virales d'HVE-1 WT et a permis d'obtenir un virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP dont le tropisme a été conservé et dont les propriétés biologiques sont équivalentes à celle de la souche parentale. Ces résultats permettent ainsi de confirmer les résultats obtenus par Naigaike en démontrant que la région intergénique entre les gènes codant pour les protéines du tégument VP11/VP12 et VP13/14 des alphaherpèsvirus constitue un locus fiable pour l'insertion d'ADN exogène. Cependant, même si des niveaux de répllication équivalents sont obtenus au bout de 6j d'infection, le nombre de copies d'ADN viral tend à être légèrement plus faible pour l'HVE-1 ANCHORGFP. Afin de vérifier si cette légère diminution peut être induite par l'insertion du système ANCHOR™, il pourrait être intéressant de comparer la cinétique d'HVE-1 ANCHORGFP avec celle d'un HVE-1 WT qui aurait subi un nombre de passages identiques sur cellules RK13.

Le virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP obtenu a ensuite été utilisé pour étudier le cycle d'infection et l'étape répllication d'HVE-1 dans deux lignées cellulaires.

Cela a notamment permis d'observer différents phénotypes cellulaires selon leur stade d'infection et de visualiser pour la première fois la formation des centres répliatifs d'HVE-1 en cellules vivantes.

Cette étude a également permis de visualiser les étapes tardives du cycle viral avec la formation de syncytia dans les cellules RK13 et a également permis de confirmer que ces syncytia correspondent à une cellule géante unique possédant un réseau de filaments d'actine propre formé par la fusion des cellules entre elles. Curieusement, les cellules englobées dans ces syncytia sont le plus souvent dans un stade de réplication avancée et présentent de larges centres répliatifs, laissant penser que ces cellules géantes ne représentent pas uniquement un moyen de transmission mais constituent une structure de production virale à part entière permettant la libération d'un grand nombre de particules virales lors de l'étape finale de lyse cellulaire.

Dans les cellules ED, l'infection était très prononcée et la grande majorité des cellules présentaient de larges centres répliatifs similaires à ceux observés dans les cellules RK13, signifiant que les mécanismes de réplication d'HVE-1 ne diffèrent pas selon le type cellulaire. Aucun syncytium n'a été observé dans les cellules ED, ce qui est cohérent avec le fait que l'effet cytopathique dans les cellules ED induit la compaction et l'arrondissement des cellules et non leur fusion, témoignant ainsi d'une voie de transmission via le milieu extracellulaire.

Nous avons pu vérifier que HVE-1 ANCHORGFP a conservé son tropisme et est toujours capable d'infecter des cellules équine, et de s'y multiplier, mais uniquement à forte MOI. Cette diminution de permissivité des cellules équine peut s'expliquer par les passages successifs de HVE-1 ANCHORGFP sur RK13 lors de sa purification et de sa production. En effet, il a été démontré par Sugahara et al que l'herpèsvirus équin a un fort potentiel d'adaptabilité lors de son passage répété sur des cellules non équine, entraînant ainsi une mutation dans le gène de la glycoprotéine C nécessaire à l'entrée, et ainsi induisant une préférence de liaison sur les héparanes sulfates, récepteurs privilégiés pour l'infection des cellules non équine [313].

Ainsi, le virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP, dont l'infection et la réplication peuvent être suivies en temps réel, ou utilisé en combinaison avec des techniques de marquage actuelles comme l'immunofluorescence, représente un nouvel outil très intéressant pour l'étude du cycle viral et son utilisation pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents.

Après avoir testé les capacités d'HVE-1 ANCHORGFP pour le suivi et l'étude du cycle viral, son potentiel pour l'identification de molécules antivirales a été évalué.

Pour cela, un algorithme de quantification a tout d'abord été mis au point sur notre plateforme de microscopie à haut contenu permettant ainsi de déterminer le taux d'infection (nombre de cellules GFP+ / nombre total de cellules) et le taux de réplication (intensité totale des spots fluorescents) d'HVE-1 ANCHORGFP. Un test de 80 composés de la chimiothèque Prestwick Chemical, incluant le ganciclovir, traitement de référence actuel pour lutter contre HVE-1, a été réalisé en conditions réelles de criblage et a ainsi permis d'identifier 3 molécules antivirales. Parmi elles, le ganciclovir a été retrouvé et présente la plus forte activité antivirale avec une réduction de l'infection et de la réplication d'environ 90% pour une concentration de 2 μ M, démontrant l'efficacité de l'association entre notre virus recombinant ANCHOR et la microscopie à haut contenu pour la découverte de molécules antivirales. Les deux autres molécules identifiées démontrent une activité antivirale plus faible que celle du ganciclovir avec une diminution moyenne de 70 et 50 % et correspondent respectivement à l'auranofine et à l'azacytidine-5.

L'auranofine est un inhibiteur des enzymes redox utilisé couramment pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde et dont l'activité antivirale contre le HIV-1 et le SARS-CoV2 a été respectivement démontrée en 2019 et 2020 [314] [315].

L'azacytidine-5, quant à lui, est un inhibiteur de la méthylation de l'ADN utilisé pour le traitement de la leucémie myéloïde aigüe et présente une activité antivirale contre plusieurs rétrovirus [316] [317].

Ainsi, l'HVE-1 ANCHORGFP développé dans cette étude est un outil très intéressant qui a permis de confirmer l'activité antivirale du ganciclovir contre HVE-1 et de mettre en lumière l'activité antivirale de l'auranofine et de l'azacytidine-5 contre les virus à ADN.

Afin de vérifier que cette quantification est suffisamment efficace pour être utilisée lors d'une campagne de criblage à haut contenu, le Z' factor a été déterminé pour chacun des paramètres étudiés et est respectivement de 0,61 pour le taux d'infection et de 0,56 pour le taux de réplication, démontrant que la combinaison entre l'HVE-1 ANCHORGFP et la microscopie à haut contenu est un outil robuste et puissant pour la découverte de molécules antivirales.

Suite à cette phase de calibration, l'HVE-1 ANCHORGFP va être utilisé lors d'une campagne de criblage à haut contenu de la totalité de la chimiothèque Prestwick Chemical afin d'identifier de nouvelles molécules contre l'herpèsvirus équin de type 1.

Chapitre 5.

HVE-1 ANCHORGFP et criblage à haut contenu pour l'identification de nouvelles molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin de type 1

I. Préambule

L'herpèsvirus équin de type 1 est un agent pathogène majeur pour le cheval, pour lequel aucun traitement n'est disponible, et dont la vaccination ne permet pas une protection optimale. Pour répondre à la problématique du manque de techniques de quantification pour le HCS et à la carence en traitements antiviraux, un herpèsvirus équin de type 1 ANCHORGFP auto-fluorescent, dont l'infection et la réplication sont quantifiables et qui montre un fort potentiel pour le HCS, a été développé.

Ainsi dans ce chapitre, les 1280 composés de la chimiothèque Prestwick Chemical ont été testés sur HVE-1 ANCHORGFP dans une campagne de criblage à haut contenu en 3 étapes afin de découvrir de nouvelles molécules antivirales.

II. Matériel et Méthodes

II.1 Protocole de criblage

II.1.1 Criblage primaire et secondaire

Pour les deux premières étapes du criblage, la banque fille Prestwick diluée à 0,4mM dans du DMSO a été utilisée.

Des cellules RK13 ont étéensemencées à une densité de 8 000 cellules par puits dans un volume de 90µL dans 16 plaques P96 Corning Black Bottom et incubées 24h à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Le lendemain, 99µL de milieu de culture ont été ajoutés dans chaque puits et les cellules ont été traitées avec 1µL de composé puis infectées avec 10µL d'une suspension d'HVE-1

ANCHORGFP afin d'atteindre une concentration finale de $2\mu\text{M}$ dans 0,5% DMSO et une MOI de 1 (volume final de $200\mu\text{L}$).

Après 48h d'incubation, les cellules ont été fixées avec une solution de formaline à 4% et incubées 10 minutes à température ambiante puis les noyaux cellulaires ont été marqués à l'aide d'une solution de PBS contenant $1\mu\text{g/mL}$ de Hoechst.

L'acquisition des données a été réalisée avec le microscope à haut contenu CX7 à l'aide du protocole décrit dans le chapitre 4. La normalisation a ensuite été effectuée sur les valeurs des puits contrôles DMSO et le Z' factor de chaque plaque a également été déterminé.

Le criblage secondaire de confirmation de l'activité antivirale a été réalisé dans les mêmes conditions, mais les composés ont été testés en triplicat.

II.1.2 Détermination des fenêtres thérapeutiques

Pour la détermination des fenêtres thérapeutiques des composés dont l'activité antivirale a été confirmée, la banque fille Prestwick diluée à 4mM dans du DMSO a été utilisée afin de pouvoir traiter les cellules à des concentrations plus importantes.

La fenêtre thérapeutique de chaque composé, aussi appelée *selectivity index* (SI), permet de déterminer l'intérêt d'un composé pour une utilisation en clinique et son potentiel comme futur traitement, et a été calculée selon la formule $\text{SI} = \text{CC50} / \text{IC50}$, à partir de la moyenne de trois expériences indépendantes.

II.1.2.1 Calcul de l'IC50

Pour déterminer la concentration induisant une diminution de 50% de l'infection et de la réplication virale d'HVE-1 (IC50), des dilutions de raison 10 allant de 4mM à $0,004\text{mM}$ ont été réalisées. L'infection par HVE-1 étant influencée par la concentration en DMSO, chaque dilution a été préparée avant traitement afin d'atteindre une concentration finale de 0,5% DMSO dans les puits.

Le protocole de traitement et d'infection appliqué est identique à celui décrit précédemment, mis à part que les composés ont été testés à 4 concentrations finales ($20\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$, $0,2\mu\text{M}$ et $0,02\mu\text{M}$).

Après analyse et normalisation, l'IC50 a été déterminée à l'aide du logiciel Combenefit [318].

II.1.2.2 Calcul de la CC50

La mesure de la cytotoxicité de chaque composé a été réalisée avec les mêmes dilutions que celles utilisées pour le calcul des IC50, et selon le même protocole, mis à part que 109 μ L de milieu ont été ajoutés le jour du traitement pour atteindre un volume final de 200 μ L. La concentration induisant 50% de mort cellulaire (CC50) a été déterminée partir du nombre total de cellules à l'aide du logiciel Combenefit.

Une étude de perméabilité cellulaire et de potentiel mitochondrial a également été réalisée à l'aide de l'Image-IT™ DEAD Green Viability Screen (Invitrogen) et du MitoTracker™ Orange CMTMRos (Invitrogen) respectivement. L'Image IT DEAD Green Viability est un marqueur de perméabilité cellulaire qui pénètre et fluoresce dans les cellules mortes. Le MitoTracker™ est une sonde qui est oxydée dans les cellules vivantes et séquestrée dans les mitochondries où elle fluoresce.

Après traitement et incubation pendant 48h, le milieu a été retiré et les cellules ont été traitées avec 100 nM de Image IT DEAD Green Viability et 400 nM de MitoTracker™, et replacées à 37°C pendant 30 minutes. Après incubation, le milieu a été enlevé et les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS avant d'être fixées comme précédemment décrit. Les noyaux cellulaires ont ensuite été marqués avec une solution de PBS/Hoechst (1 μ g/mL).

L'analyse a également été effectuée au CX7 et consiste à la quantification de l'intensité de fluorescence émettant dans le vert pour la perméabilité cellulaire et dans le rouge pour le potentiel mitochondrial.

II.1.2.3 Détermination de la fenêtre thérapeutique de composés propriétaires

En plus des composés antiviraux identifiés au sein de la banque Prestwick, la fenêtre thérapeutique du LAVR289 et du LB56, deux composés propriétaires ayant montré une activité à large spectre contre les poxvirus et le cytomégalovirus humain, a également été déterminée [319].

Pour cela, le LAVR289 et le LB56 ont été solubilisés dans du DMSO à une concentration stock de 10mM et leur IC50 et CC50 ont été déterminées en suivant un protocole identique à celui décrit ci-dessus. Leur activité antivirale étant de l'ordre du nM contre les poxvirus, ces composés ont été testés à 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M et 0,001 μ M pour l'activité antivirale et 50 μ M, 10 μ M, 1 μ M et 0,1 μ M pour la cytotoxicité. Comme précédemment, une étude de la

perméabilité cellulaire et du potentiel mitochondrial a été réalisée pour approfondir leur cytotoxicité.

Afin d'estimer et de comparer leur efficacité vis-à-vis des traitements actuels, le ganciclovir (50mM stock, Roche) a également été testé dans les mêmes conditions.

III. Résultats

III.1 Identification de nouvelles molécules antivirales

La première étape du criblage à haut contenu, appelée criblage primaire, a pour but d'éliminer les composés qui ne présentent aucune activité antivirale. De plus, afin de réduire les coûts de traitement et de le rendre compatible pour traiter un animal très lourd, il est nécessaire d'identifier des molécules actives à faible concentration. Ainsi, lors du criblage primaire, les 1280 composés de la Prestwick ont été testés à une concentration finale de $2\mu\text{M}$ en simplicat (Figure 70).

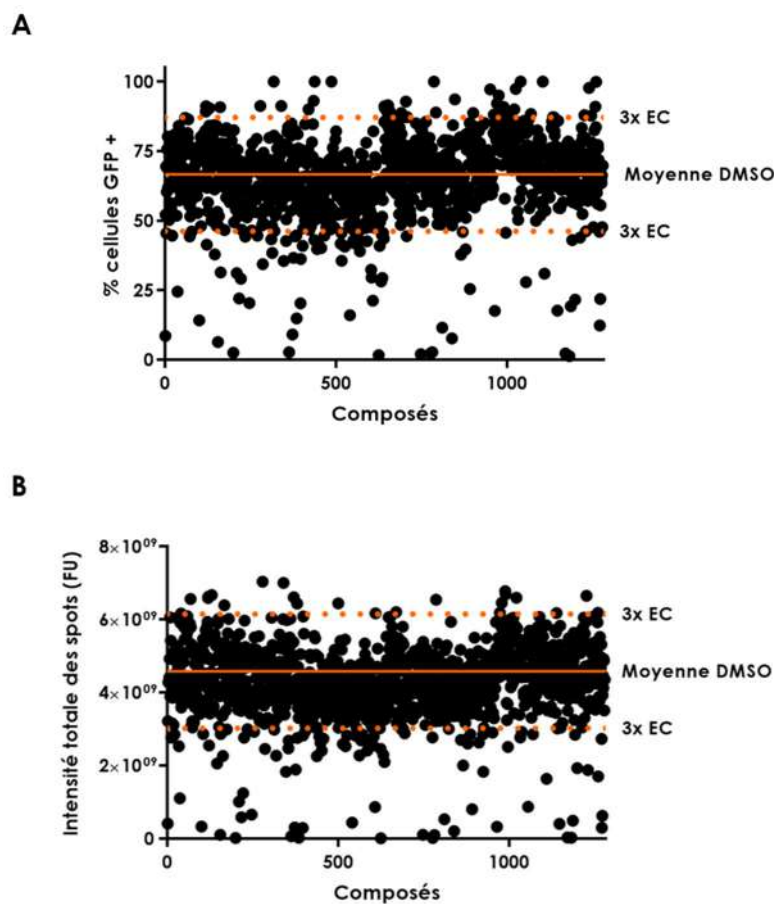


Figure 70. Activité des 1280 composés de la banque Prestwick Chemical contre HVE-1.

Des cellules RK13 ont été traitées avec $2\mu\text{M}$ de chaque composé et infectées avec HVE-1 ANCHORGFP à MOI 1. L'acquisition des résultats a été réalisée au CX7, objectif 10x. A. Graphique représentant le taux

d'infection de chaque composé correspondant au pourcentage de cellules GFP+. B. Graphes montrant le taux de réplication d'HVE-1 ANCHORGFP selon chaque composé, représenté par l'intensité totale de fluorescence des spots.

Pour chaque paramètre, la moyenne obtenue pour le contrôle DMSO est représentée et correspond à la moyenne des 16 plaques nécessaires au criblage primaire (ligne orange). Les lignes en pointillés orange représentent la limite basse et haute de sélection des inhibiteurs et des activateurs et correspondent à 3x la valeur de l'écart-type (EC) obtenu pour les 16 plaques du criblage.

Comme attendu, la majorité des composés ne démontrent aucune activité antivirale et sont répartis de manière homogène entre les limites de sélection fixées à 3 fois la valeur de l'écart-type. Cependant, nous pouvons observer qu'une petite centaine de composés induisent une diminution du nombre de cellules GFP+ et de l'intensité totale des spots fluorescent et peuvent correspondre à des molécules antivirales. Certains composés se localisent également au-dessus de la limite haute 3x EC et pourraient ainsi correspondre à des activateurs.

Avant d'analyser plus en détail les résultats, le Z' factor de chaque plaque a été calculé afin de déterminer si les résultats obtenus sont fiables et robustes (Figure 71).

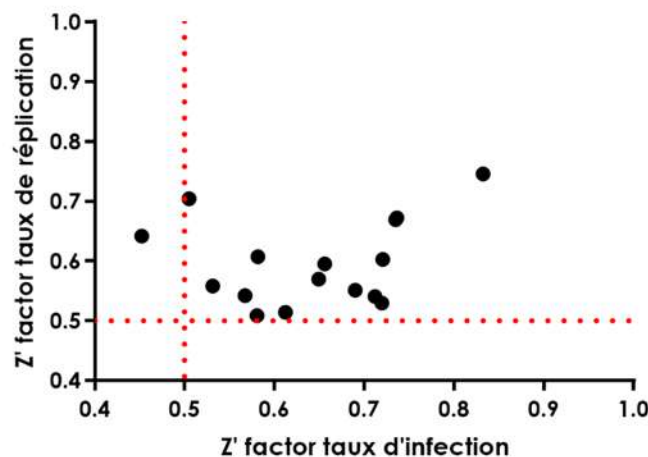


Figure 71. Z' factor

Graphique représentant le Z' factor du taux de réplication (vertical) en fonction du Z' factor du taux d'infection (horizontal) pour chaque plaque du criblage primaire. Les lignes pointillées représentent la valeur de 0,5 à partir de laquelle le criblage est considéré comme excellent.

Sur les 16 plaques, 15 d'entre elles possèdent un Z' factor pour le taux d'infection et le taux de réplication supérieur à 0,5 signifiant que les résultats obtenus pour ces 15 plaques sont excellents. Une des plaques présente un Z' factor de 0,64 pour le taux de réplication mais

légèrement inférieur à 0,5 pour le taux d'infection, et pourrait être le résultat d'une infection non homogène.

Ainsi, le Z' factor moyen obtenu pour l'ensemble du criblage primaire est respectivement de 0,64 pour le taux d'infection et de 0,60 pour le taux de réplication, confirmant la robustesse de l'HVE-1 ANCHORGFP et de sa quantification pour le criblage à haut contenu et la découverte de molécules antivirales.

Pour la sélection des inhibiteurs et des activateurs, les seuils de détection bas et haut ont été déterminés pour chaque plaque et correspondent à la moyenne des valeurs contrôles DMSO à laquelle a été soustraite ou ajoutée 3 fois la valeur de l'écart-type du contrôle. Pour chacune des 16 plaques, les composés dont le taux d'infection ou le taux de réplication se situe sous le seuil limite bas ont été considérés comme inhibiteurs d'HVE-1 (Figure 72A), tandis que ceux dont les taux d'infection et de réplication se situent au-dessus de la limite haute ont été considérés comme activateurs (Figure 72B).

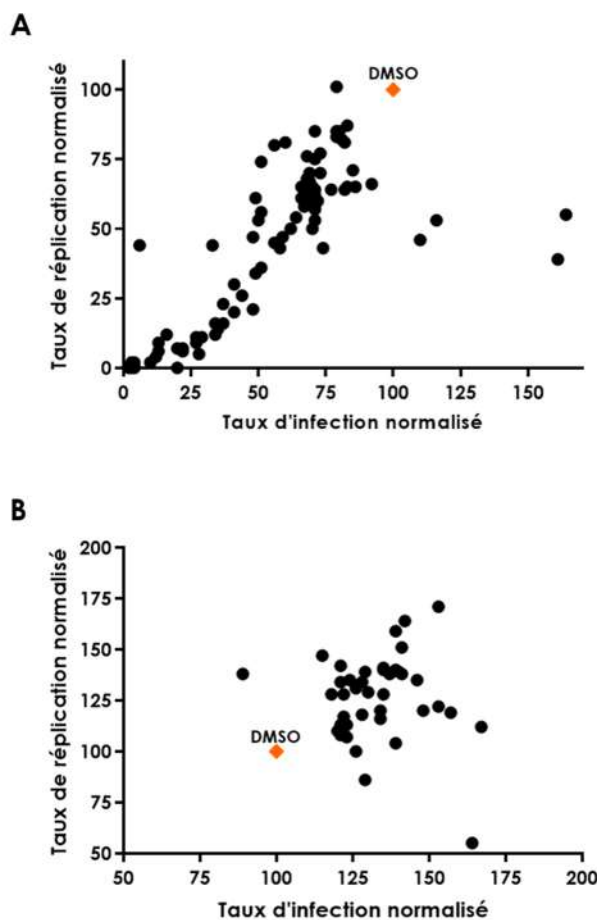


Figure 72. Activité des inhibiteurs et des activateurs d'HVE-1 identifiés.

A. Inhibiteurs d'HVE-1. Graphique représentant le taux de réplication d'HVE-1 selon le taux d'infection d'HVE-1 des composés situés sous le seuil de sélection, le tout étant normalisé par rapport aux valeurs

contrôles DMSO. B. Activateurs. Graphique représentant le taux de réplication d'HVE-1 selon le taux d'infection d'HVE-1 situés au-dessus du seuil de sélection, les valeurs étant normalisées par rapport à celles des contrôles DMSO des composés. **Losange orange** : contrôle DMSO.

Ainsi, 89 composés induisent une diminution du taux d'infection ou du taux de réplication d'HVE-1. Ces composés semblent se répartir en deux groupes majoritaires : un groupe à forte activité antivirale avec des molécules induisant une diminution du taux de réplication ou du taux d'infection de plus de 50%, et un groupe avec une activité antivirale modérée dont l'inhibition d'HVE-1 est comprise entre 25 et 50%. Mis à part un composé qui semble être préférentiellement un inhibiteur de l'infection, l'ensemble des composés semblent inhiber de manière similaire l'infection et la réplication virale. Quatre composés présentent cependant un profil original avec une diminution du taux de réplication et une augmentation du taux d'infection.

Concernant les activateurs, 44 molécules induisent une augmentation du taux de réplication et d'infection d'HVE-1. Comme pour les inhibiteurs, 2 composés ont un profil original. L'un inhibe complètement la réplication mais augmente le taux d'infection de plus de 60% tandis que l'autre augmente uniquement la réplication d'HVE-1.

Avant de considérer ces composés comme inhibiteurs ou activateurs, la cytotoxicité de chacun de ces composés a été analysée (Figure 73).

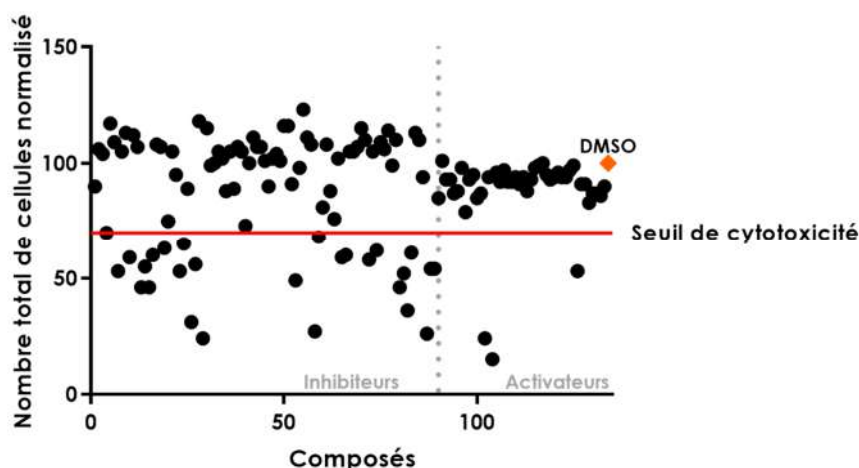


Figure 73. Cytotoxicité des composés identifiés.

Graphique représentant le nombre total de cellules normalisé par rapport aux valeurs contrôles DMSO (**losange orange**) pour chaque composé supposé inhibiteur ou activateur. Un composé induisant plus de 30% de mort cellulaire a été considéré comme cytotoxique. Le seuil de détection est indiqué par la ligne rouge. La ligne grise en pointillés marque la séparation entre les inhibiteurs et les activateurs.

Ainsi parmi les 133 composés identifiés comme potentiels inhibiteurs ou activateurs de l'infection ou de la réplication d'HVE-1, 29 (26 inhibiteurs et 3 activateurs) entraînent une diminution de plus de 30% du nombre de cellules et sont donc considérés comme cytotoxiques. Par conséquent, 63 composés peuvent être considérés inhibiteurs (Annexe 1) et 41 comme activateurs (Annexe 2).

Parmi ces composés cytotoxiques se trouvent les 4 composés « inhibiteurs » au profil original, signifiant que l'augmentation du taux d'infection est due à la faible densité de cellules présentes dans le puits.

La majorité des composés inhibiteurs identifiés sont couramment utilisés dans les domaines de l'infectiologie et de la neurologie, et constituent principalement des antibactériens, antiparasitaires et des anticonvulsifs (Figure 74A).

Pour les activateurs, les composés anti-infectieux représentent également une grande proportion des molécules identifiées, notamment les antibactériens, mais ne constituent pas le domaine majoritaire. En effet, la majorité des composés activateurs ont un effet sur le système nerveux central et regroupent des molécules utilisées pour le traitement de la maladie de parkinson, des anticonvulsifs et des antidépresseurs. Une forte proportion de composés activateurs correspond également à des antihistaminiques utilisés pour le traitement des allergies. (Figure 74B).

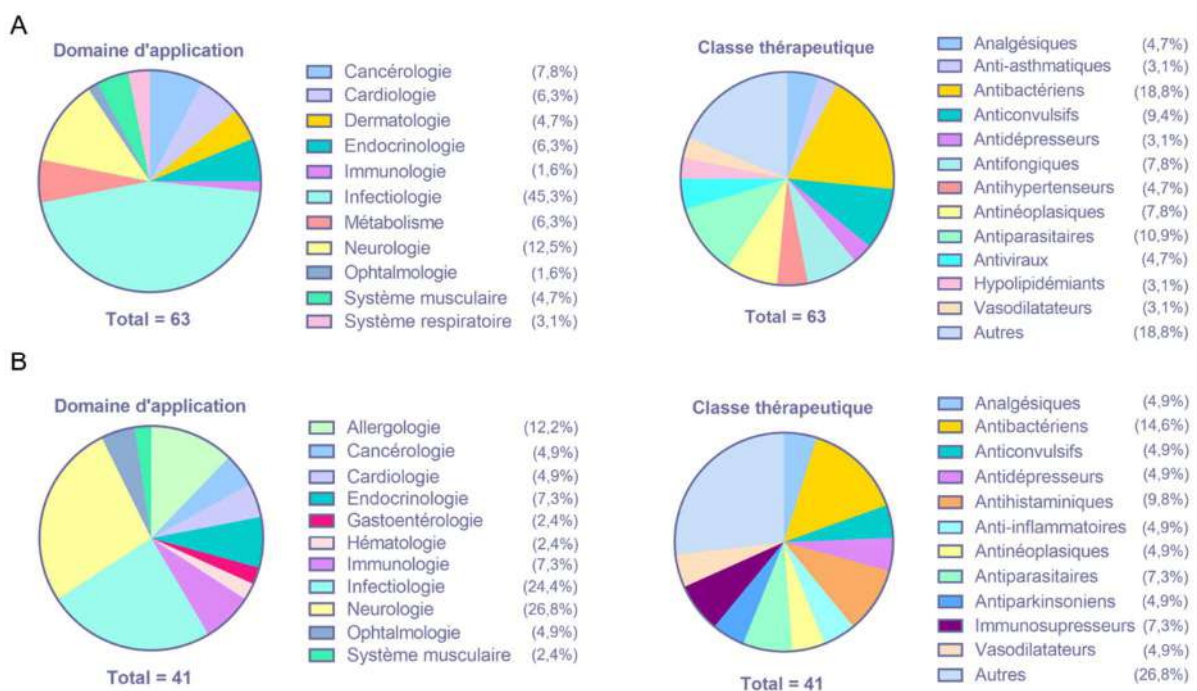


Figure 74. Domaine d'application et classe thérapeutiques des inhibiteurs et activateurs d'HVE-1 identifiés lors du criblage primaire.

La proportion de chaque domaine d'application ou classe thérapeutique est indiquée entre parenthèse et correspond au rapport du nombre de composés présents dans ce domaine ou classe sur le nombre total de composés identifiés. La catégorie « autres » regroupe des classes thérapeutiques identifiées par un seul composé. A. Inhibiteurs. B. Activateurs

Cependant, afin d'identifier des composés avec une forte activité antivirale, nous nous sommes uniquement intéressés aux composés induisant une diminution d'au moins 40% du taux d'infection et du taux de réplication (Figure 75) (Annexe 1).

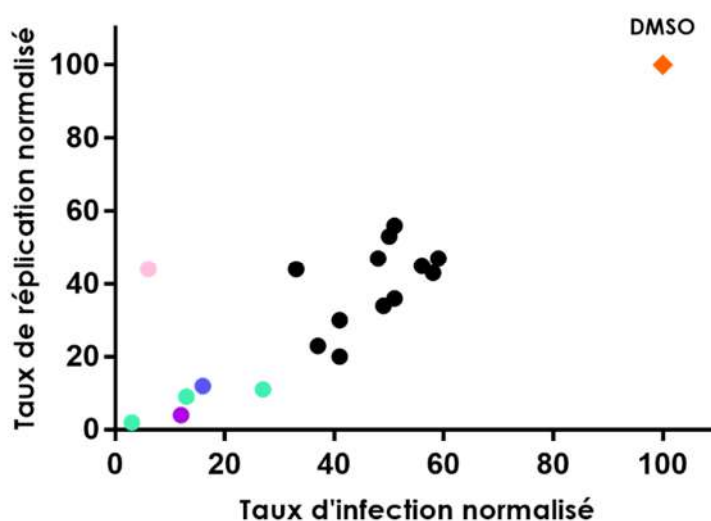


Figure 75. Activité antivirale des composés sélectionnés.

Graphique représentant le taux de réplication normalisé par rapport au taux d'infection normalisé des 18 composés sélectionnés pour leur activité antivirale contre HVE-1. **Losange orange** : contrôle DMSO. **Violet** : ganciclovir. **Vert** : composés avec activité proche de celle du ganciclovir (monensine, azaguanine-8, cidofovir éthanolamine). **Bleu** : auranofine. **Rose** : azacytidine-5.

Sur l'ensemble des composés, seuls 18 ont une activité antivirale contre HVE-1 de plus de 40%. Parmi ces composés se trouve le ganciclovir, ce qui confirme une nouvelle fois la robustesse de la technique utilisée pour l'identification de molécules antivirales. L'auranofine et l'azacytidine-5 font également partie des molécules identifiées, confirmant le potentiel antiviral de ces composés.

Nous pouvons également observer que 4 composés, dont l'auranofine, présentent une activité proche de celle du traitement de référence, et 1 composé (monensine) semble même dépasser l'activité du ganciclovir et pourrait être très intéressant.

III.2 Confirmation de l'activité antivirale

Afin de confirmer leur activité antivirale, les 18 composés sélectionnés lors du criblage primaire ont été re-testés dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 76) (Annexe 3).

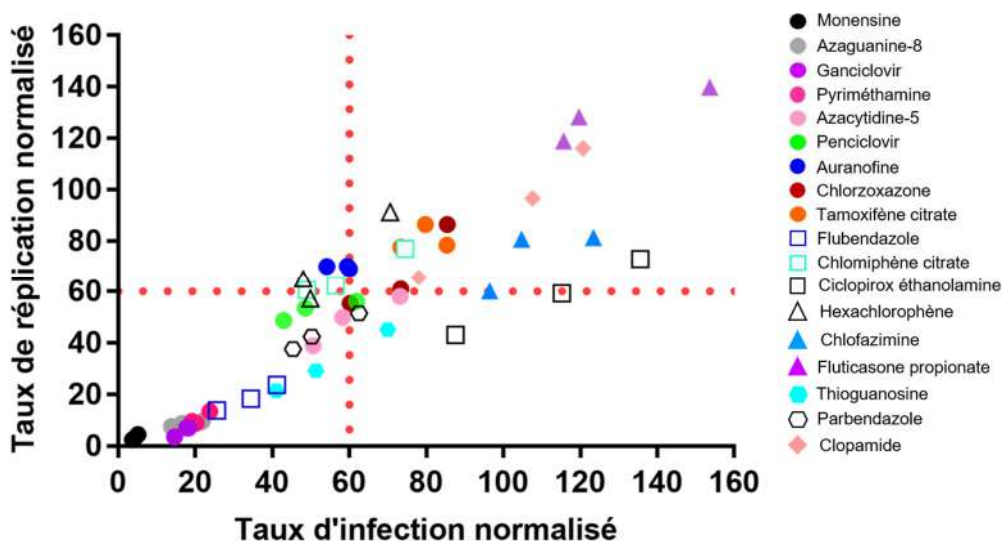


Figure 76. Activité antivirale des 18 composés du criblage secondaire.

Graphique représentant le taux de réplication normalisé par rapport au taux d'infection normalisé des 18 composés inclus dans le criblage secondaire. L'expérience ayant été réalisée en triplicat, chaque composé est représenté par trois points. Lignes pointillées rouge : seuil de sélection des composés antiviraux.

Sur les 18 composés, 4 ne confirment pas leur activité antivirale puisque leur taux d'infection est au niveau du contrôle DMSO, voire supérieur. Six autres composés, dont l'auranofine et l'azacytidine-5 confirment leur activité antivirale mais celle-ci est plus faible que celle observée lors de la première phase de criblage. Enfin, 8 composés présentent une activité antivirale de plus de 40%, dont le ganciclovir, la monensine et azaguanine-8, deux molécules intéressantes identifiées lors du criblage primaire.

III.3 Détermination des fenêtres thérapeutiques

Afin de hiérarchiser les composés entre eux, les fenêtres thérapeutiques de ces 8 composés, ainsi que celles de l'auranofine et de l'azacytidine-5, ont ensuite été déterminées. En effet, l'auranofine et l'azacytidine-5 ayant montré des activités antivirales très contradictoires entre le criblage primaire et secondaire, ces deux composés ont également été inclus dans cette dernière étape en vue de confirmer ou d'infirmer leur potentiel antiviral.

III.3.1 Etude de l'activité antivirale

Pour déterminer leur puissance antivirale, les composés ont été testés à 4 concentrations en triplicat allant de 20 μ M à 0,02 μ M par dilution de raison 10 et trois expériences indépendantes ont été réalisées. Pour chaque expérience, l'IC₅₀ des composés a été calculée à l'aide du logiciel CombeneFit (Figure 77).

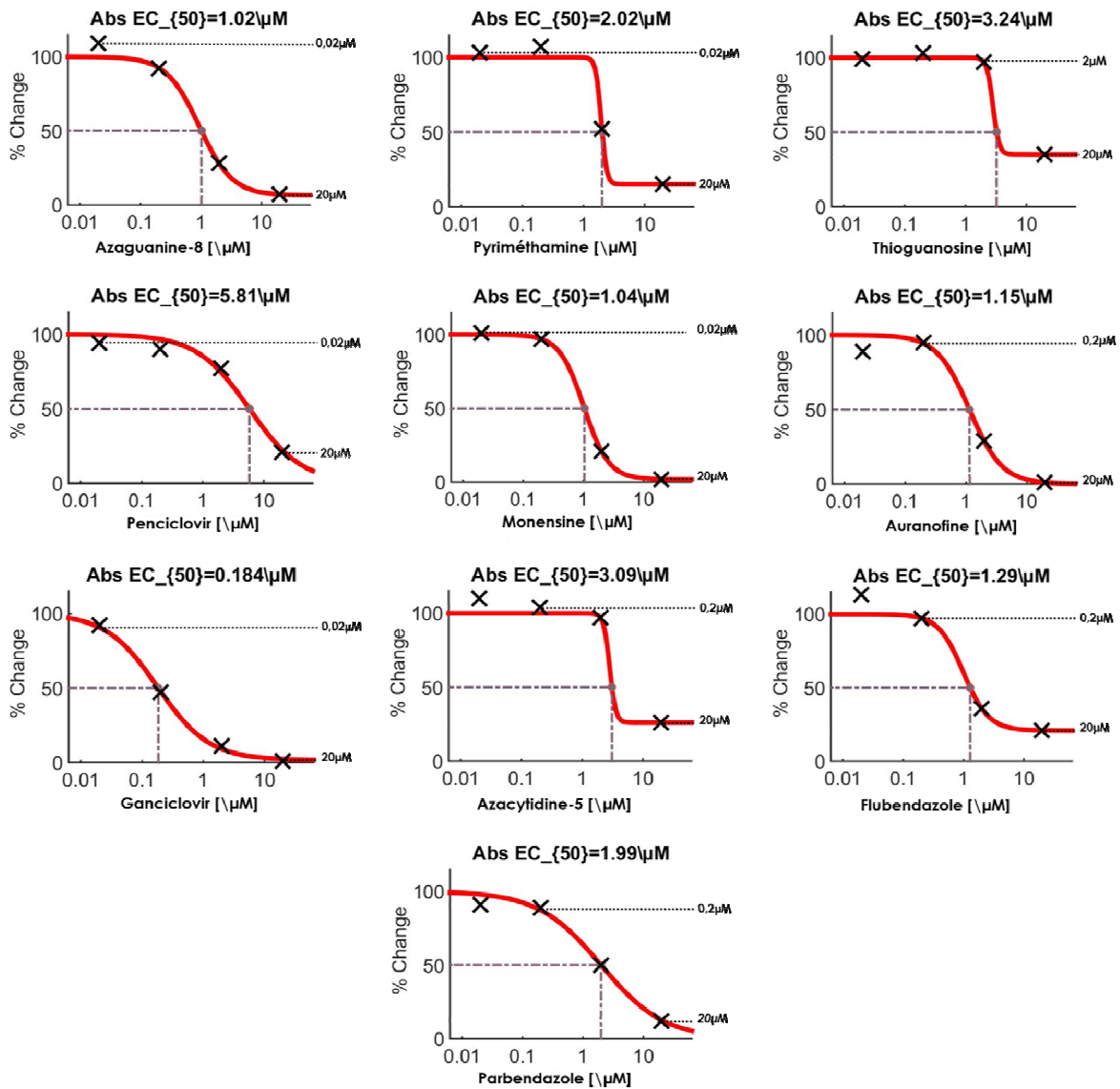


Figure 77. Exemples d'IC₅₀.

Courbes utilisées par le logiciel CombeneFit pour déterminer l'IC₅₀ de chaque composé antiviral. Les IC₅₀ d'une seule expérience indépendante sont représentées. « % change » correspond au paramètre analysé et représente ici le pourcentage de cellules GFP+ (taux d'infection). Abs EC : concentration efficace absolue.

Une fois l'IC50 déterminée pour chaque expérience indépendante, la moyenne des IC50 obtenues a été calculée (Tableau 16).

Composé	IC50 Taux d'infection (nM)	IC50 Taux de réplication (nM)
Azaguanine-8	770 ± 490	890 ± 770
Pyriméthamine	1 420 ± 1 000	1 050 ± 890
Thioguanosine	3 190 ± 1 280	7 020 ± 9 120
Penciclovir	4 560 ± 1 090	2 910 ± 1 060
Monensine	1 040 ± 510	1 300 ± 540
Auranofine	1 010 ± 520	1 220 ± 830
Ganciclovir	200 ± 30	140 ± 50
Azacytidine-5	3 820 ± 780	2 020 ± 300
Flubendazole	1 670 ± 340	2 170 ± 1 000
Parbendazole	1 760 ± 450	1 730 ± 420

Tableau 16. IC50 des 10 composés anti-HVE-1.

Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne des IC50 obtenues de 3 expériences indépendantes ± l'écart-type. Les concentrations sont exprimées en nM.

Nous pouvons observer que la thioguanosine, le penciclovir et l'azacytidine-5 ont une IC50 assez élevée de plus de 3µM témoignant d'une activité antivirale de faible potentiel. La majorité des autres composés, dont l'auranofine, présente une IC50 comprise entre 1 et 2µM confirmant une bonne activité antivirale contre HVE-1. Enfin, le ganciclovir et l'azaguanine-8 possèdent une forte activité antivirale avec une IC50 inférieure à 1µM, et même inférieure à 0,5µM pour le traitement de référence.

Mis à part la thioguanosine et l'azacytidine-5 qui semblent être respectivement inhibiteur de l'infection et inhibiteur de la réplication, les autres composés présentent une IC50 similaire pour le taux d'infection et de réplication.

III.3.2 Mesure de la cytotoxicité

Après avoir mesuré le potentiel antiviral de chacun des 10 composés sélectionnés, leur cytotoxicité a également été évaluée. Pour chaque expérience, des cellules RK13 ont été traitées en triplicat avec 20 μ M, 2 μ M, 0,2 μ M et 0,02 μ M de composé et incubées pendant 48h à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Après incubation, les cellules ont été fixées et les noyaux cellulaires marqués. L'analyse a été réalisée à l'aide du CX7 et la CC50 a été déterminée sur le nombre total de cellules avec le logiciel Combenefit à partir de 3 expériences indépendantes (Annexe 4A).

Afin d'approfondir la cytotoxicité des composés, la perméabilité cellulaire et le potentiel mitochondrial ont également été étudiés au cours d'une expérience (Figure Annexe 4B).

Comme pour l'activité antivirale, la CC50 moyenne des trois expériences indépendantes a été déterminée (Tableau 17).

Composé	CC50 (nM)
Azaguanine-8	4 410 \pm 2370
Pyriméthamine	5 280 \pm 2 120
Thioguanosine	3 850 \pm 1 770
Penciclovir	> 20 000 (N.D)
Monensine	> 20 000 (N.D)
Auranofine	3 440 \pm 660
Ganciclovir	> 20 000 (N.D)
Azacytidine-5	16 370 \pm 7 120
Flubendazole	2 160 \pm 1 020
Parbendazole	4 110 \pm 1 510

Tableau 17. CC50 des 10 composés anti-HVE-1 sur cellules RK13.

Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne des CC50 obtenues pour 3 expériences indépendantes \pm l'écart-type. Les concentrations sont exprimées en nM. Les CC50 du penciclovir, monensine et ganciclovir étant identique pour toutes les expériences l'écart-type n'a pas pu être déterminé. N.D : non déterminé.

Sur les 10 composés, le penciclovir, la monensine et le ganciclovir ne présentent aucune cytotoxicité et ne perturbent pas la perméabilité cellulaire et le potentiel mitochondrial. L'azacytidine-5 se révèle aussi intéressante puisque sa CC50 est d'environ 16 μM et qu'il n'induit une augmentation du potentiel mitochondrial et de la perméabilité cellulaire qu'à partir de 10 μM . L'azaguanine-8, la pyriméthamine, la thioguanosine et le parabendazole présentent une cytotoxicité modérée avec des CC50 comprises entre 3,85 et 5,28 μM . Cependant, hormis la pyriméthamine qui n'a pas d'effet sur l'équilibre cellulaire, ces composés perturbent le potentiel mitochondrial et/ou la perméabilité cellulaire à partir de 2 μM et pourraient avoir un effet cytotoxique plus important. Enfin, l'auranofine et le flubendazole ont une activité cytotoxique importante avec une CC50 inférieure à 3,5 μM .

III.3.3 Calcul des fenêtres thérapeutiques

Une fois que l'IC50 et la CC50 de chaque composé ont été déterminées, les fenêtres thérapeutiques (SI) peuvent être calculées afin d'identifier les composés les plus prometteurs. Etant donné que la majorité des composés présentent une activité antivirale de niveau équivalent sur l'infection et la réplication d'HVE-1, les fenêtres thérapeutiques ont été déterminées à partir des IC50 correspondant au taux d'infection (Tableau 18).

Composé	CC50 (nM)	IC50 (nM)	SI
Azaguanine-8	4 410	770	5,72
Pyriméthamine	5 280	1 420	3,72
Thioguanosine	3 850	3 190	1,21
Penciclovir	>20 000	4 560	>4,39
Monensine	>20 000	1 040	>19,23
Auranofine	3 440	1 010	3,41
Ganciclovir	>20 000	200	>100
Azacytidine-5	16 370	3 820	4,28
Flubendazole	2 160	1 670	1,29
Parabendazole	4 110	1 760	2,33

Tableau 18. Fenêtres thérapeutiques des 10 composés anti-HVE-1.

Les valeurs de CC50 et d'IC50 correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes et sont exprimées en nM. L'IC50 correspond au taux d'infection (pourcentage de cellules GFP+) et la fenêtre thérapeutique (SI) a été déterminée par le rapport CC50 / IC50 et ne possède pas d'unité. Pour une meilleure lisibilité, les écart-types des CC50 et IC50 n'ont pas été rappelés.

Suite au calcul des fenêtres thérapeutiques, les composés peuvent être hiérarchisés selon leur potentiel. Ainsi, le composé le plus puissant correspond au ganciclovir, le traitement de référence contre HVE-1, dont la fenêtre thérapeutique est supérieure à 100. Après le ganciclovir, la monensine se révèle très intéressante avec sa fenêtre thérapeutique minimale de 19,23. Malheureusement, la majorité des autres composés présente des fenêtres thérapeutiques faibles comprises entre 3,4 et 5,72 à cause de leur faible activité antivirale (penciclovir, azacytidine-5, pyriméthamine) ou de leur cytotoxicité (azaguanine-8, auranofine). Avec leur fenêtre thérapeutique inférieure à 2,5, le flubendazole, parabendazole et la thioguanosine ne peuvent pas être considérés comme de potentiels futurs traitements.

III.4 Efficacité du LAVR289 et du LB56 contre HVE-1 ANCHORGFP

Selon un procédé identique à celui mis en place pour l'étude et l'analyse de l'activité antivirale des composés de la Prestwick, 2 composés propriétaires, le LAVR289 et le LB56 ont également été testés contre HVE-1.

Ces composés ayant démontré une forte activité antivirale, de l'ordre de quelques nM, contre les poxvirus, le LAVR289 et LB56, en comparaison avec le ganciclovir, ont été testés à 5 concentrations allant de 10 μ M à 1nM par dilution de raison 10 (Figure 78).

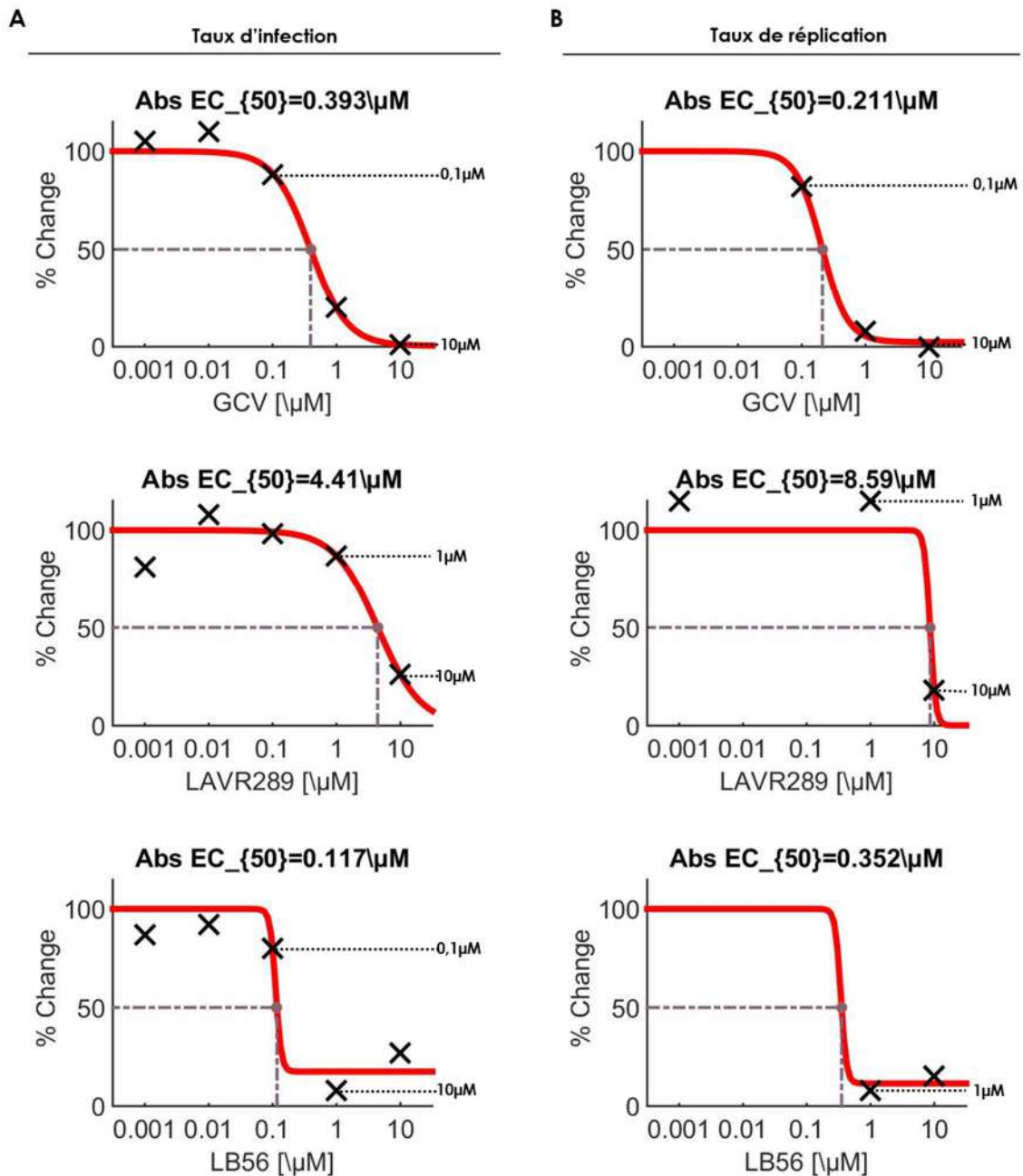


Figure 78. IC₅₀ du ganciclovir, LAVR289 et LB56.

Les IC₅₀ ont été calculées à l'aide du logiciel Combobenefit à partir des triplicats d'une seule expérience. Les composés ont été testés à 10 μM , 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM et 0,001 μM . Parfois, lorsque les valeurs sont supérieures à 100% et sont éloignées de la courbe tracée, le logiciel ne représente pas les points correspondants sur le graphique A. IC₅₀ mesurées sur le taux d'infection. B. IC₅₀ issues du taux de réplication. Abs EC : concentration efficace absolue.

En comparaison avec le ganciclovir, le LAVR289 ne semble pas efficace pour diminuer le taux d'infection ou le taux de réplication d'HVE-1. En revanche, le LB56 possède des IC₅₀ de 117 et 352 nM témoignant d'une forte activité antivirale contre HVE-1 et dont l'effet est similaire à celui obtenu avec le traitement de référence.

Comme procédé pour les composés de la Prestwick, la cytotoxicité du LAVR289 et du LB56 a également été mesurée (Figure 79).

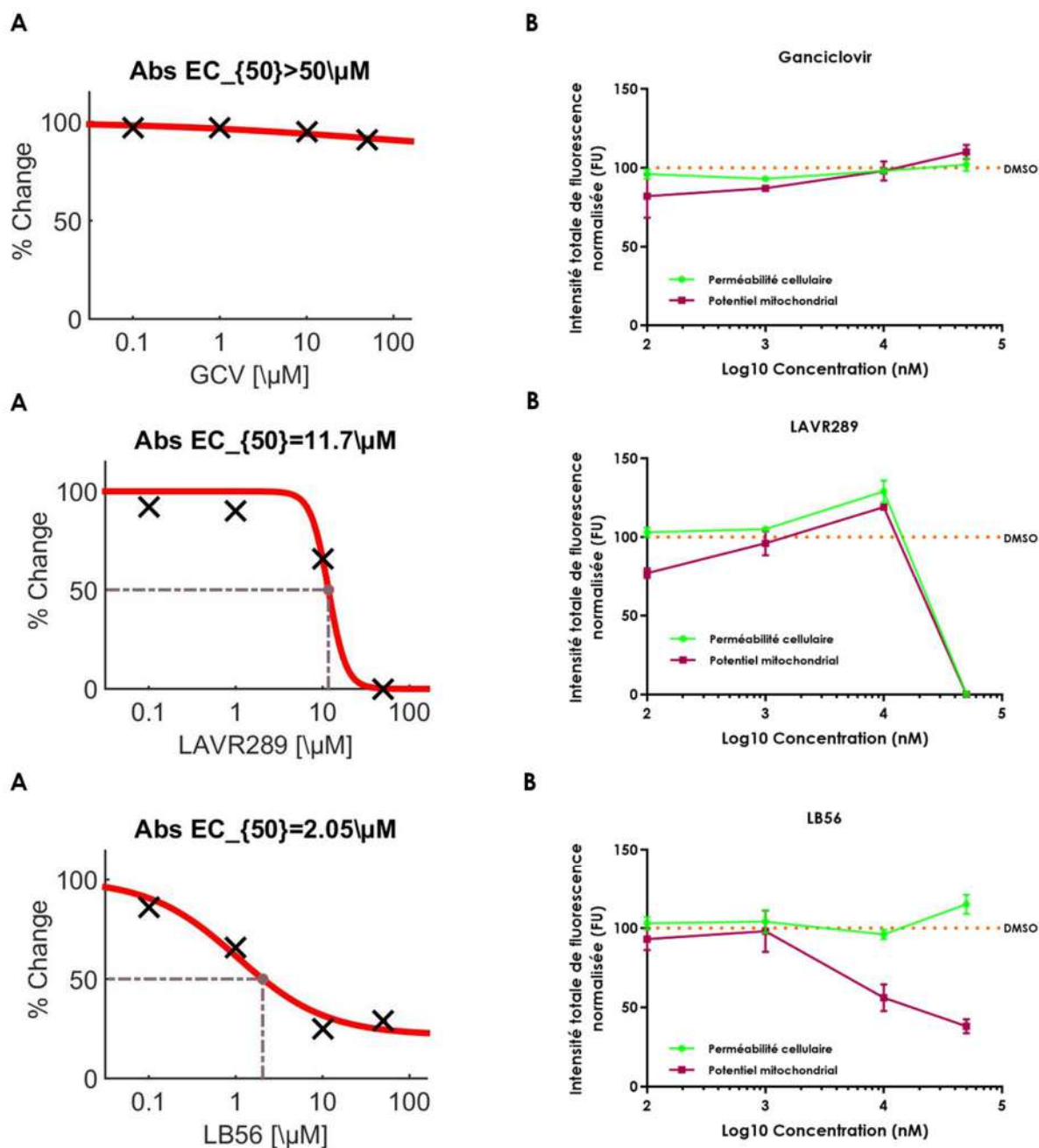


Figure 79. Cytotoxicité du ganciclovir, LAVR289 et LB56.

Les composés ont été testés à 50μM, 10μM, 1μM, 0,1μM sur des cellules RK13. A. CC50. Les CC50 ont été calculées à l'aide du logiciel Combobenefit à partir des triplicats d'une seule expérience et sont exprimées en μM. GCV : ganciclovir. Abs EC : concentration efficace absolue. B. Graphiques représentant la perméabilité cellulaire et le potentiel mitochondrial, tous deux exprimés en unité de fluorescence et normalisés sur les valeurs contrôles DMSO, selon la concentration de composé. Les concentrations sont représentées sur une échelle logarithmique (base 10) et exprimées en nM. Les données correspondent à la moyenne et l'écart-type des triplicats d'une seule expérience.

Comme attendu, le ganciclovir ne présente aucune cytotoxicité même à une concentration de 50 μ M. Jusqu'à 10 μ M, le LAVR289 n'entraîne aucune cytotoxicité, mais une fois cette concentration dépassée, le composé devient toxique et induit une chute brutale de la perméabilité cellulaire et du potentiel mitochondrial, d'où une mort cellulaire importante. En revanche, le LB56 présente une forte cytotoxicité avec une CC50 de 2,05 μ M confirmée par une diminution du potentiel mitochondrial.

Afin de comparer le potentiel du LAVR289 et du LB56 par rapport au ganciclovir, leur fenêtre thérapeutique respective a été déterminée (Tableau 19).

Composé	CC50 (nM)	IC50 (nM)	SI
Ganciclovir	>50 000	393	>127
LAVR289	11 700	4 410	2,65
LB56	2 050	117	17,52

Tableau 19. Fenêtre thérapeutique du ganciclovir, LAVR289 et LB56.

Les valeurs de CC50 et d'IC50 correspondent à la moyenne des triplicats d'une seule expérience et sont exprimées en nM. L'IC50 correspond au taux d'infection (pourcentage de cellules GFP+) et la fenêtre thérapeutique (SI) a été déterminée par le rapport CC50 / IC50.

Avec une fenêtre thérapeutique supérieure à 127, le ganciclovir est toujours le composé le plus puissant. Par contre, même si sa cytotoxicité est importante, grâce à sa forte activité antivirale, le LB56 présente une fenêtre thérapeutique convenable et constitue le deuxième composé le plus intéressant découvert dans cette étude, après la monensine.

IV. Discussion

Dans cette partie, l'HVE-1 ANCHORGFP a été utilisé afin d'identifier de nouvelles molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin de type 1. Pour cela, l'ensemble des 1280 composés contenus dans la chimiothèque Prestwick Chemical ont été testés lors d'une campagne de criblage de trois étapes successives.

Lors du criblage primaire, 63 composés ont démontré une activité antivirale contre HVE-1. Parmi ces composés, le ganciclovir, traitement de référence de HVE-1, et le penciclovir, un antiviral dont l'activité sur HVE-1 a été démontrée auparavant, ont été identifiés, confirmant que la technique utilisée est efficace et robuste pour la découverte de molécules antivirales. La grande majorité des composés identifiés correspond à des anti-infectieux et plus principalement des antibactériens, des antiparasitaires et des antifongiques. Cependant, les antibactériens sont une classe thérapeutique très représentée et constituent à eux seuls près de 15% de la Prestwick, ce qui est en corrélation avec les 18% d'antibactériens identifiés lors de cette campagne. En revanche, les antiparasitaires et les antifongiques représentent respectivement près de 11% et 7,5% des molécules antivirales identifiés, alors qu'ils ne constituent que 3,4% des composés présents dans la chimiothèque, indiquant que ces deux classes thérapeutiques pourraient constituer de nouvelles perspectives d'étude pour l'identification de molécules anti-HVE-1.

Pour essayer de répondre à la problématique du prix des traitements actuels, il est nécessaire d'identifier des composés avec une forte activité antivirale dont l'utilisation ne nécessiterait qu'une faible quantité de molécule. De ce fait, seuls les composés induisant une diminution du taux d'infection et du taux de réplication de plus de 40% ont été sélectionnés. Ainsi 18 composés ont été inclus dans la deuxième phase de criblage, représentant un *hit rate* de 1,4%. Lors de cette étape, 8 des 18 composés re-testés ont confirmé leur activité antivirale : l'azaguanine-8, la pyriméthamine, la thioguanosine, le penciclovir, la monensine, le ganciclovir, le flubendazole et le parabendazole.

L'azaguanine-8 est un analogue de la purine agissant sur la maturation des ARN ribosomiaux et qui est principalement utilisé comme anti-cancéreux [320]. Il présente également une activité antivirale contre le virus de la vaccine [321] et contre le virus de Marburg [322].

La pyriméthamine est un inhibiteur de la synthèse de l'ADN principalement utilisé comme antiparasitaire pour traiter le paludisme et la toxoplasmose [323] [324] et dont l'activité antivirale contre le virus de la rage a été démontrée récemment [325].

La thioguanosine est un analogue de la guanosine utilisé chez l'Homme pour le traitement de la leucémie myéloïde aigüe [326] mais qui démontre également une activité antivirale contre les virus à ARN, notamment les rotavirus et le SARS-CoV2 [327] [328].

La monensine est un antibactérien principalement utilisé en médecine vétérinaire pour le traitement de la cétose chez les vaches laitières et dont l'activité antivirale contre plusieurs herpèsvirus et le virus de la stomatite vésiculeuse ont été démontrées [329] [330] [331].

Le flubendazole est un antiparasitaire à large spectre utilisé principalement comme vermifuge en médecine humaine mais aussi vétérinaire. Peu d'études sont disponibles sur ses propriétés antivirales, mais le flubendazole serait également un activateur de l'autophagie ayant un effet sur la transmission des particules du VIH entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T [332].

Tout comme le flubendazole, le parabendazole est un antiparasitaire utilisé chez l'Homme et l'animal dont l'activité antivirale a été peu démontrée [333].

Etrangement, deux composés, l'auranofine et l'azacytidine-5, qui présentaient une forte activité antivirale lors de la phase primaire ne démontrent qu'une faible activité lors de cette étape, contrairement aux 9 autres composés dont l'activité était modérée au départ et qui n'ont pas été confirmés lors de cette phase. Lors de cette étape, malgré un protocole d'ensemencement identique, les cellules étaient moins confluentes que lors du criblage primaire, et le taux d'infection obtenu plus faible, ce qui a pu jouer sur l'activité des composés. Dans le but de confirmer ou d'infirmer leur activité antivirale, l'azacytidine-5 et l'auranofine ont également été inclus dans la dernière phase du criblage correspondant à la hiérarchisation des composés.

Afin de mesurer leur puissance et leur potentiel comme médicament, les fenêtres thérapeutiques de ces 10 composés ont été déterminées. Comme attendu pour le traitement de référence d'HVE-1, le ganciclovir présente une très bonne fenêtre thérapeutique qu'aucun autre composé n'arrive à atteindre. Cependant, en raison du manque de l'absence de la thymidine kinase d'HVE-1 dans les cellules non infectées, la concentration cytotoxique (CC50) réelle du ganciclovir ne peut être mesurée *in vitro* [334] [335].

Malheureusement, la plupart des autres composés se montrent rapidement cytotoxiques et possèdent par conséquent une faible fenêtre thérapeutique. En revanche, la monensine démontre une forte activité antivirale et n'est pas cytotoxique, ce qui lui confère ainsi une bonne fenêtre thérapeutique. Cependant, cette molécule se révèle toxique chez le cheval rendant ainsi compliquée son utilisation pour le traitement de la rhinopneumonie équine [336] [337].

En parallèle des 1280 composés approuvés par la FDA et l'EMA contenus dans la chimiothèque Prestwick, deux composés propriétaires, dont l'activité antivirale à large spectre a récemment été démontrée, ont également été étudiés.

Le premier composé, appelé LAVR289 est un nouvel analogue nucléosidique acyclique faisant l'objet d'une demande de dépôt de brevet et qui a démontré de fortes activités antivirales contre des poxvirus, des herpèsvirus et l'adénovirus de type 5. Afin d'augmenter son domaine d'application, son efficacité contre l'herpèsvirus équin de type 1 a été évaluée sur cellules RK13. Malheureusement, le LAVR289 se révèle inefficace sur ce modèle cellulaire. Ce défaut d'activité antivirale a déjà été observé sur d'autres types cellulaires, dont les Vero et les A549. En effet, le LAVR289 est une prodrogue dont l'activité est dépendante de son clivage par une estérase. Ainsi, malgré son fort potentiel antiviral, ce composé est inefficace dans les cellules déficientes en cette enzyme, dont font sûrement partie les cellules RK13. L'étude de l'activité du LAVR289 sur un type cellulaire différent, notamment sur les cellules équines, pourraient ainsi permettre de vérifier cette hypothèse.

Le second composé, dénommé LB56, correspond à une nouvelle classe d'inhibiteurs constituée de fluorocorrols et développée initialement pour apporter de nouvelles perspectives de traitement pour le hCMV [319]. Ce composé a également démontré une forte activité antivirale contre les poxvirus et présente une très bonne efficacité contre HVE-1. Malgré sa forte cytotoxicité sur RK13, le LB56 présente une fenêtre thérapeutique de 17,5, et peut représenter le point de départ pour de futurs traitements.

Dans ce projet, l'attention a été portée sur les inhibiteurs de l'infection et de la réplication de l'herpèsvirus équin de type 1. Cependant, la combinaison de la technologie ANCHOR™ avec le HCS permet de réaliser des criblages phénotypes et d'identifier à la fois les inhibiteurs mais aussi les activateurs de l'infection et de la réplication virale.

Ainsi lors du criblage primaire, 41 molécules ont démontré une potentielle augmentation du taux d'infection et / ou du taux de réplication de l'herpèsvirus équin de type 1. Parmi ces molécules, une grande majorité de composés agissant sur le système nerveux central ont été mis en lumière, avec une répartition homogène des différentes classes thérapeutiques. En revanche, il est intéressant de constater que près de 10% des activateurs identifiés correspondent à des antihistaminiques bloquant tous le récepteur à l'histamine H1. Ainsi, il semblerait que le récepteur H1 ou la voie de signalisation sous-jacente pourraient avoir un rôle dans l'infection par HVE-1 et pourrait ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique.

Cependant, afin de valider ces résultats, l'activité de ces 41 molécules devra être re-testée dans le cadre d'un criblage secondaire.

Chapitre 6.

Quantification automatisée de l'effet cytopathique pour une identification rapide de molécules antivirales

I. Préambule

Malgré les nombreux avantages qu'elle apporte pour l'étude et la quantification de la réplication virale, la technologie ANCHOR™ nécessite d'être insérée dans le génome viral. Comme expérimenté pendant ma thèse, les processus de construction et de développement d'un virus recombinant sont longs et requièrent de nombreuses étapes. Ainsi, alors que la construction du plasmide de transfert prenait du temps et retardait l'obtention de l'HVE-1 ANCHORGFP, élément essentiel pour la suite de ma thèse et l'identification de molécules antivirales, je me suis retrouvée dans l'impossibilité de réaliser une campagne de criblage à haut contenu.

Pour répondre à cette problématique, et pour m'affranchir des systèmes rapporteurs utilisant la fluorescence, je me suis tournée vers la quantification de l'effet cytopathique. En effet, dans l'optique de mettre en place un système peu coûteux, il est nécessaire d'utiliser une méthode nécessitant un nombre d'étapes limité et peu de réactifs. A l'heure actuelle, l'observation de l'effet cytopathique est l'un des moyens de quantification d'un processus viral le plus facile à mettre en place et le plus abordable. Ainsi, afin de pouvoir identifier rapidement des molécules antivirales lors de campagnes de HCS sans utiliser de système rapporteur et à faible coût, des algorithmes de quantification automatisée de l'effet cytopathique, fondés sur le même principe que celui des plages de lyse, ont été développés à l'aide des bio-applications disponibles sur notre microscope à haut contenu CX7.

II. Matériel et Méthodes

II.1 Quantification automatisée sur RK13

Pour les premiers essais de mise au point et de mesure du bruit de fond, et comme l'infection par HVE-1 est influencée par le DMSO et que les composés de la Prestwick sont dilués dans ce solvant, les cellules ont été traitées avec 1% de DMSO et infectées avec HVE-1 WT à une MOI de 0,001 (l'HVE-1 ANCHORGFP n'étant pas encore développé à ce stade). Une étape de calibration utilisant la plaque de la Prestwick contenant le ganciclovir a ensuite été réalisée.

Pour les essais suivants, la mise au point de l'algorithme de quantification automatisée des syncytia et sa calibration pour le HCS ont été réalisées sur les plaques du criblage primaire d'HVE-1 ANCHORGFP et celles ayant permis de déterminer les IC50.

II.2 Quantification automatisée sur ED

II.2.1 Mise au point de l'algorithme

Pour la quantification de l'effet cytopathique d'HVE-1 sur les cellules ED, 10 000 cellules ont étéensemencées en plaque P96 Corning et incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Vingt-quatre heures après ensemencement, les cellules ED ont été traitées avec 0,5% de DMSO et infectées avec HVE-1 WT à MOI 0,08.

II.3 Etude comparative entre la quantification d'HVE-1 ANCHOGFP, la quantification automatisée de l'ECP et la qPCR

Pour mesurer l'efficacité de ces deux algorithmes de quantification, les résultats d'IC50 obtenus pour la quantification du ganciclovir ont été comparés avec ceux obtenus par la quantification d'HVE-1 ANCHORGFP et par qPCR.

Pour les expériences de qPCR sur cellules ED, l'utilisation d'un algorithme ne nécessitant pas la fixation des cellules a permis de réaliser l'extraction de l'ADN à partir des puits sur lesquels l'ECP a été quantifié de manière automatisée.

Pour la quantification de l'ADN viral sur RK13, les cellules ont étéensemencées, traitées avec le ganciclovir infectées avec HVE-1 ANCHORGFP comme décrit précédemment lors de 3 expériences indépendantes. Après 48h d'infection, l'ADN viral a été extrait et pour chaque expérience, la quantification par qPCR a été réalisée en triplicat.

III. Résultats

III.1 Développement d'une quantification automatisée des syncytia sur cellules RK13

Dans le modèle cellulaire RK13, l'infection par l'herpèsvirus équin de type 1 se manifeste par la formation de larges syncytia facilement visualisables et apparaissant dès 24h post-infection.

III.1.1 Mise au point de l'algorithme de quantification

III.1.1.1 Essai de quantification directe sur la lumière transmise

Afin de quantifier les syncytia, la méthode la plus rapide aurait été d'identifier directement ces cellules géantes à partir de la lumière transmise. Cependant, pour réaliser ces analyses, le logiciel du CX7 se fonde sur des bio-applications intégrées dont la première étape est toujours représentée par l'identification des objets (cellules). En général, cette étape fait appel à un marquage nucléaire permettant ainsi de délimiter précisément chaque objet par l'intensité de fluorescence. Malheureusement, pour l'identification des syncytia en lumière transmise, la différence d'intensité entre ces cellules géantes et les cellules non infectées ne fut pas suffisante pour permettre une délimitation précise et satisfaisante des syncytia.

III.1.1.2 Algorithme de quantification en 3 étapes

Ainsi, un deuxième test a été réalisé en utilisant un algorithme de quantification à plusieurs étapes sur cellules fixées, dont le noyau a été marqué à l'aide d'une solution de PBS/Hoechst, et fondé sur la bio-application de type « spot detector ». Dans ce test, la détection de spot n'est pas requise et n'a pas été utilisée, mais cette application permet d'analyser un grand nombre de paramètres et d'accéder à de nombreuses options.

Premièrement, les objets ont été délimités selon un procédé identique à celui utilisé pour l'identification des cellules pour la quantification d'HVE-1 ANCHORGFP. Cependant, afin que les cellules présentes à l'intérieur des syncytia ne soient pas individualisées, le seuil de segmentation a dû être diminué (Figure 80).

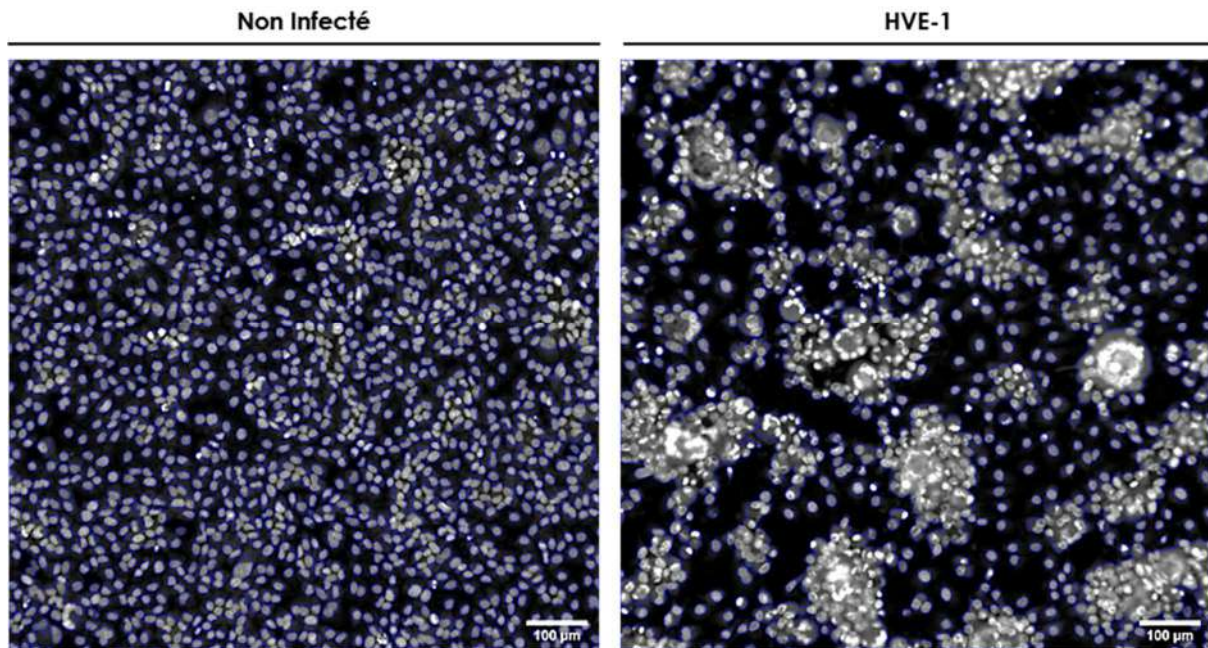


Figure 80. 1^{ère} étape : identification et délimitation des syncytia et des cellules uniques

L'algorithme de détection et de segmentation correspond aux lignes bleues. L'acquisition a été réalisée au CX7, objectif 10x. Un seul champ est représenté. Barre d'échelle = 100 µm.

Lorsque les cellules sont infectées, une mortalité cellulaire apparaît suite à l'infection, ce qui permet à la fois une bonne délimitation des syncytia et des cellules uniques isolées. Afin de ne sélectionner que les syncytia, une limite de taille basée sur l'aire des objets a été appliquée afin d'éliminer les cellules uniques. Par contre, dans la condition non infectée, les cellules sont confluentes et collées les unes aux autres, et le faible seuil de sélection requis pour l'identification des syncytia entraîne également la détection d'amas de cellules non infectées dans la condition contrôle. La quantification avec cette seule étape entraînerait un bruit de fond trop important et sert donc de point de départ pour l'identification des objets d'intérêt.

Afin de limiter ce bruit de fond, une sélection plus précise des syncytia doit être effectuée. Malheureusement, l'accès à certaines options de paramétrage de la bio-application nécessite d'abord de sélectionner des objets d'intérêt grâce à leur intensité de fluorescence. S'agissant d'un système de quantification sans marqueur fluorescent, le second canal utilisé correspond à la lumière transmise. Tout comme précédemment, la différence d'intensité entre les syncytia et les amas de cellules non infectées est trop faible pour sélectionner uniquement les plages correspondant à l'effet cytopathique et le bruit de fond est toujours important (Figure 81).

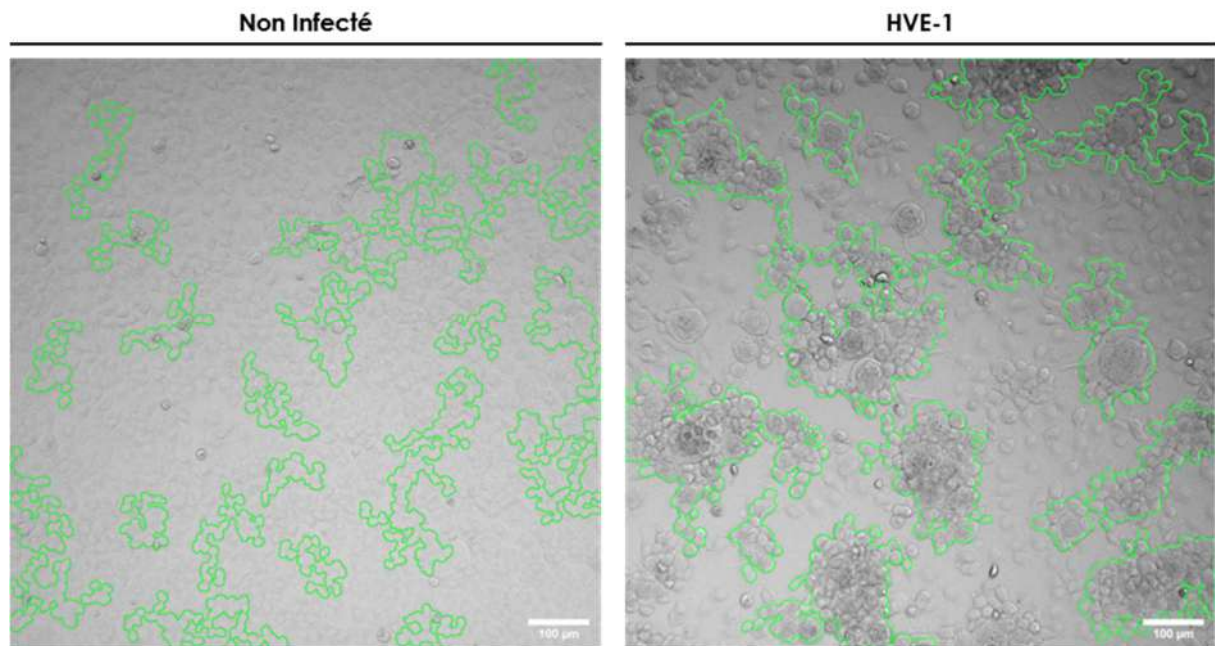


Figure 81. 2^{ème} étape : sélection sur la lumière transmise

L'algorithme de sélection des syncytia (HVE-1, à droite) et des amas cellulaires (non infecté, à gauche) est représenté en vert. Les images ont été obtenues avec le CX7, objectif 10x et représentent un seul champ d'acquisition. Barre d'échelle = 100 µm.

Maintenant que la « sélection » des objets a été effectuée, il est possible d'accéder aux options de l'application, et plus particulièrement de quantifier uniquement certains objets d'intérêt parmi les objets sélectionnés dans la deuxième étape. De cette façon, un filtre de sélection se fondant sur l'aire des objets sélectionnés a été appliqué afin de quantifier uniquement les objets de grande taille correspondant aux syncytia (Figure 82).

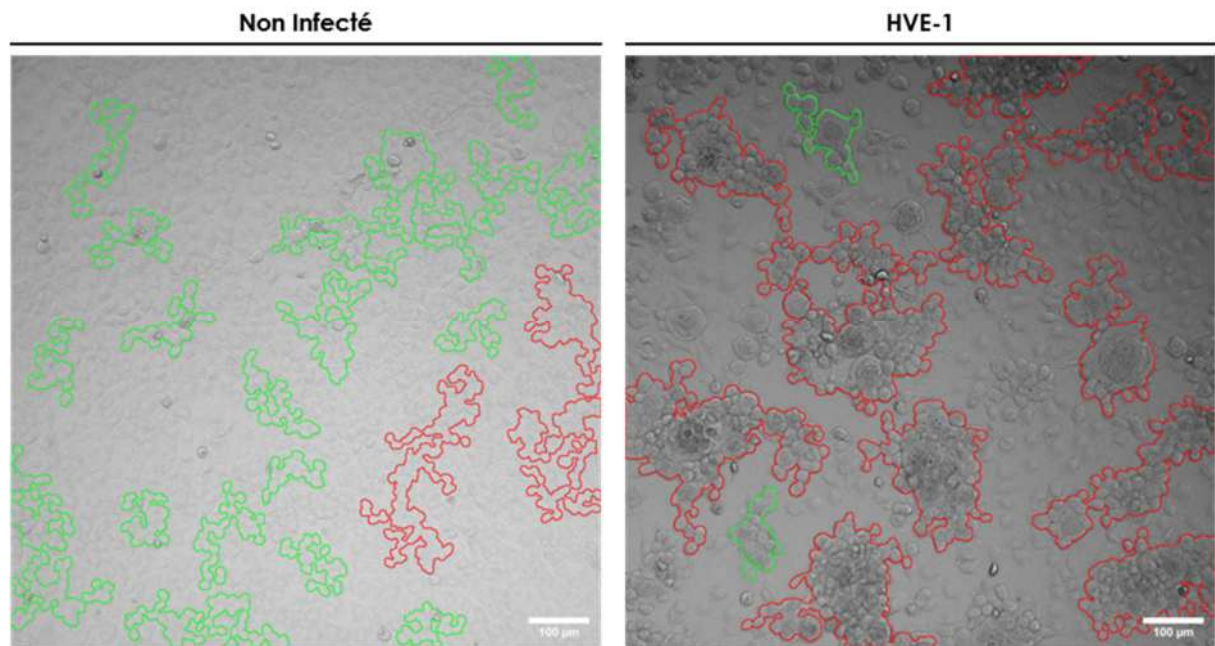


Figure 82. 3^{ème} étape : sélection et quantification des syncytia.

En vert sont représentés les objets sélectionnés lors de la 2^{ème} étape. Les lignes rouges correspondent aux objets quantifiés après application du filtre de sélection basé sur l'aire des objets. L'image représente un seul champ d'acquisition et a été acquise avec le CX7 à l'objectif 10. Barre d'échelle = 100 µm.

On peut ainsi observer que la proportion d'objets sélectionnés suite à l'application du filtre est plus importante lorsque les cellules sont infectées par rapport au contrôle non infecté, ce qui signifie que cet algorithme permet d'enrichir la sélection des syncytia et de réduire le bruit de fond.

Cependant, afin de vérifier que cet algorithme peut être utilisé de manière précise et que la différence entre des cellules infectées par HVE-1 et des cellules non infectées est bien visible, une analyse de ces paramètres a été réalisée en triplicat (Figure 83).

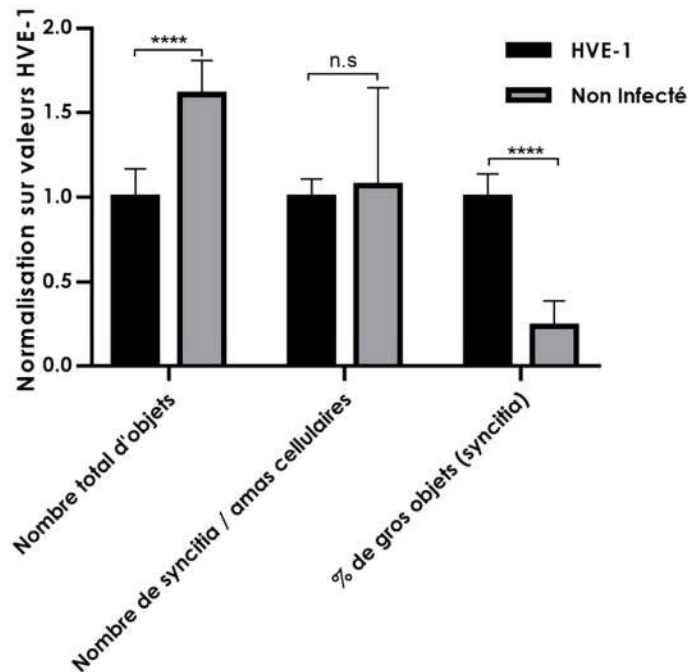


Figure 83. Paramètres obtenus par la quantification automatisée à 3 étapes.

Graphiques représentant les différents paramètres quantifiés par l'algorithme selon l'étape considérée. Lors de la première étape de délimitation et de segmentation, le nombre total d'objets correspondant aux cellules isolées et aux amas cellulaires / syncytia est calculé. La deuxième étape de sélection sur la lumière transmise permet d'accéder au nombre de syncytia ou d'amas cellulaires, tandis que le filtre de restriction appliqué lors de la dernière étape permet d'obtenir le pourcentage de gros objets parmi les amas cellulaires / syncytia calculés précédemment. Les valeurs correspondent à la normalisation des données de chaque paramètre sur les valeurs obtenues pour la condition HVE-1. Les statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 7 à l'aide d'un test de student non apparié. ****: p-value < 0.0001. n.s : non significatif

L'utilisation de cet algorithme permet ainsi de quantifier plusieurs paramètres. Tout d'abord, lors de la première étape de délimitation (lignes bleues) il est possible de quantifier le nombre total d'objets regroupant à la fois le nombre d'amas cellulaires / syncytia et le nombre de cellules uniques. On peut observer que le nombre total d'objets est significativement plus élevé dans le groupe non infecté, ce qui est attendu puisque les cellules de cette condition ne sont pas impactées par HVE-1 et sont donc confluentes.

La deuxième étape, réalisée sur la lumière transmise, ne réalise pas de sélection et ne permet donc pas de réduire le bruit de fond comme le confirme la quantification du nombre de syncytia / amas cellulaires pour laquelle les valeurs obtenues sont similaires entre la condition infectées HVE-1 et non infectée.

Enfin, l'algorithme quantifie un dernier paramètre correspondant à la proportion de gros objets au sein de tous les amas cellulaires / syncytia quantifiés à l'étape précédente. Ainsi, nous pouvons observer que la proportion de gros objets dans la condition non infectée est significativement plus faible par rapport à la condition infectée, démontrant que le dernier filtre de restriction appliqué permet bien de sélectionner les gros objets correspondant aux syncytia et de réduire le bruit de fond.

Afin de déterminer si cet algorithme peut être utilisé lors de campagne de criblage à haut contenu et permettre l'identification de molécules antivirales, des cellules RK13 ont été traitées avec 80 composés de la chimiothèque Prestwick Chemical, dont le ganciclovir, à 2 μ M (1% DMSO final) et infectées avec HVE-1 WT à MOI 0,001. L'effet cytopathique a ensuite été mesuré 48h post-infection à l'aide de l'algorithme décrit ci-dessus. Après quantification, le pourcentage de bruit de fond a été calculé et a été retiré dans toutes les conditions avant normalisation sur les valeurs contrôles DMSO (Figure 84).

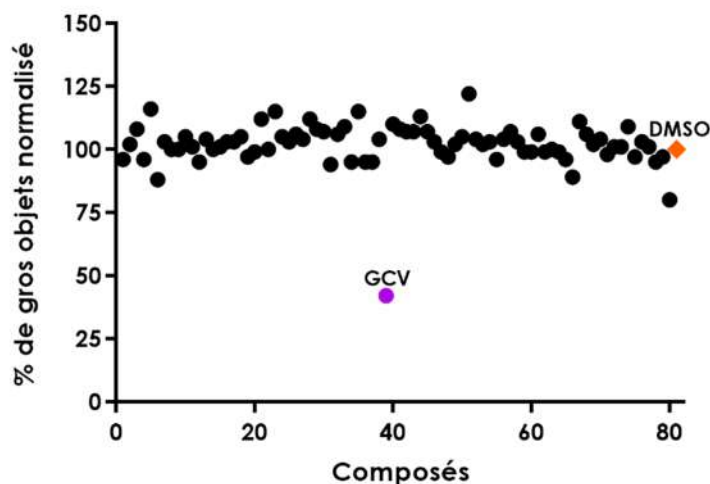


Figure 84. Mesure de l'activité antivirale de 80 composés de la Prestwick.

Graphique représentant le % de gros objets contenus dans la population d'amas cellulaire / syncytia pour chaque composé. Ces valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne des contrôles DMSO. Losange orange : contrôle DMSO. Violet : ganciclovir (GCV).

Sur les 80 composés, 79 présentent un pourcentage de gros objets similaire à celui du contrôle DMSO et n'ont donc pas d'activité antivirale. Comme attendu, le ganciclovir est bien identifié comme molécule antivirale mais son action est plus faible que celle observée dans le chapitre précédent et pourrait être due à la présence résiduelle de bruit de fond.

Le Z' factor de cette expérience a également été déterminé et est de 0,45, ce qui signifie que la quantification est bonne, mais pas excellente et que des étapes d'optimisation sont encore nécessaires.

En plus de démontrer un manque de précision dans la mesure de l'activité antivirale, l'acquisition des données par cet algorithme de quantification est assez lente comparée à celle de l'HVE-1 ANCHORGFP et plusieurs heures sont nécessaires pour obtenir les résultats d'une seule plaque 96 puits.

De ce fait l'utilisation de cet algorithme de quantification de l'effet cytopathique en 3 étapes est difficilement compatible avec du HCS.

III.1.1.3 Quantification automatisée des syncytia

Ainsi, afin de mettre au point un système de quantification plus précis et plus rapide, un troisième essai a été réalisé en se basant uniquement sur l'intensité de fluorescence du marquage nucléaire et la taille des objets identifiés. En effet, nous avons pu remarquer que l'intensité du marquage nucléaire est plus forte à l'intérieur des syncytia par rapport à celle observée pour les cellules non infectées. Cependant, cette différence est faible et le seul réglage des limites de détection ne permettait pas de bien mettre en évidence les syncytia. Pour résoudre ce problème et accentuer cette différence, les cellules ont été excitées avec un temps d'exposition plus faible afin de faire ressortir les objets de forte intensité correspondant, pour la grande majorité, aux syncytia. Une fois les images acquises, la détection des objets a été réalisée en utilisant l'intensité du marquage nucléaire avec un seuil de détection plus élevé que ceux utilisés précédemment pour délimiter uniquement les objets de forte intensité. Un filtre de sélection fondé sur l'aire des objets a ensuite été appliqué afin d'éliminer les objets intenses de petite taille correspondant aux débris cellulaires ou aux cellules en cours de division, et de ne quantifier que les syncytia (Figure 85).

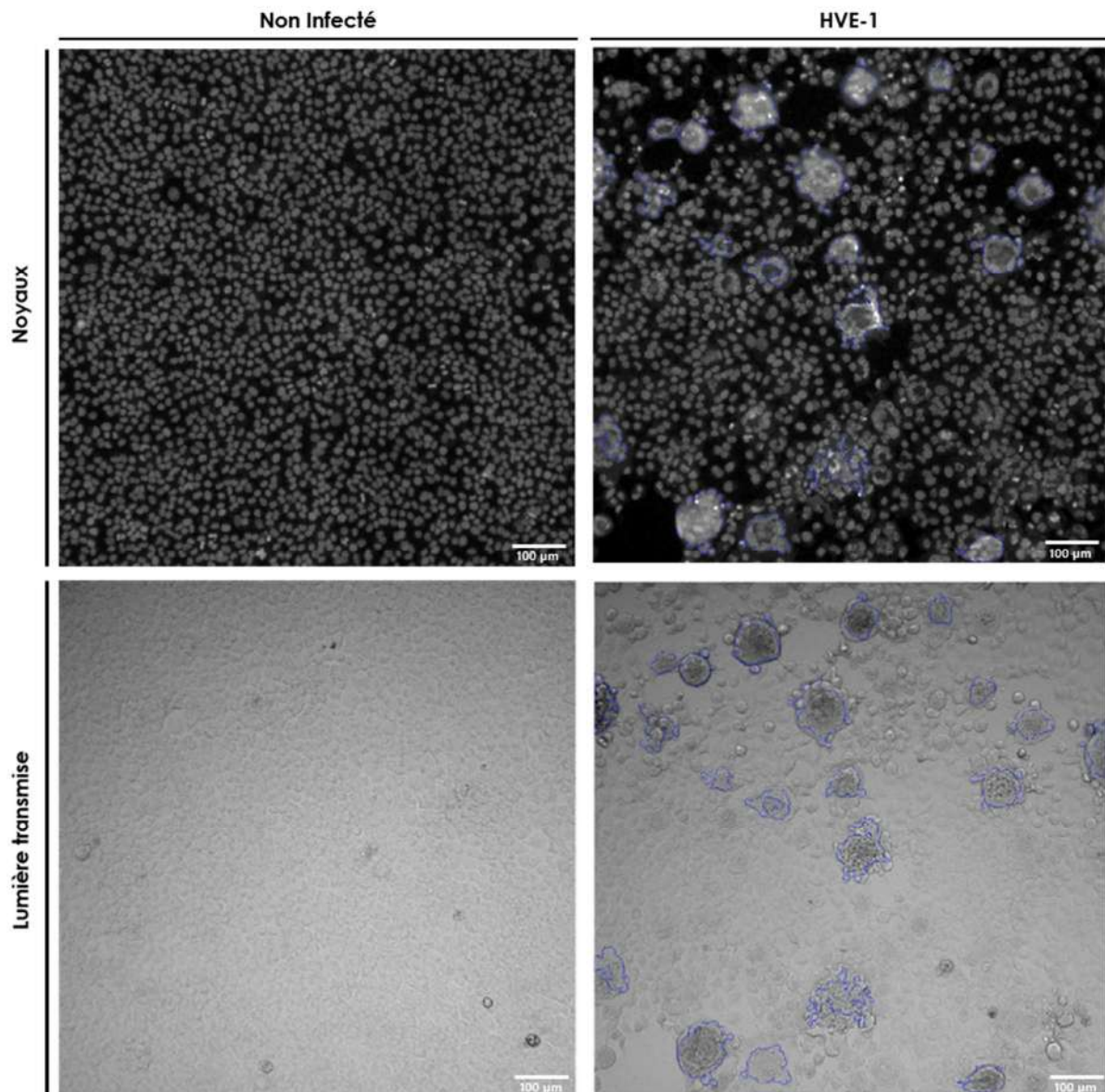


Figure 85. Algorithme de quantification automatisée des syncytia.

L'algorithme de quantification est représenté en bleu. Une transposition de l'algorithme sur la lumière transmise est également représentée. L'image a été acquise avec le CX7, objectif 10x et correspond à un seul champ. Barre d'échelle = 100 µm.

Ainsi, seuls les syncytia sont délimités par l'algorithme et nous pouvons observer que les objets sélectionnés correspondent bien à l'effet cytopathique visualisable en lumière transmise. De plus, aucun objet n'est sélectionné dans la condition non infectée, laissant supposer que cet algorithme pourrait constituer une nouvelle méthode de quantification pour la découverte de molécules antivirales. Afin de confirmer cette hypothèse, cet algorithme de quantification a été utilisé pour mesurer le bruit de fond (Figure 86).

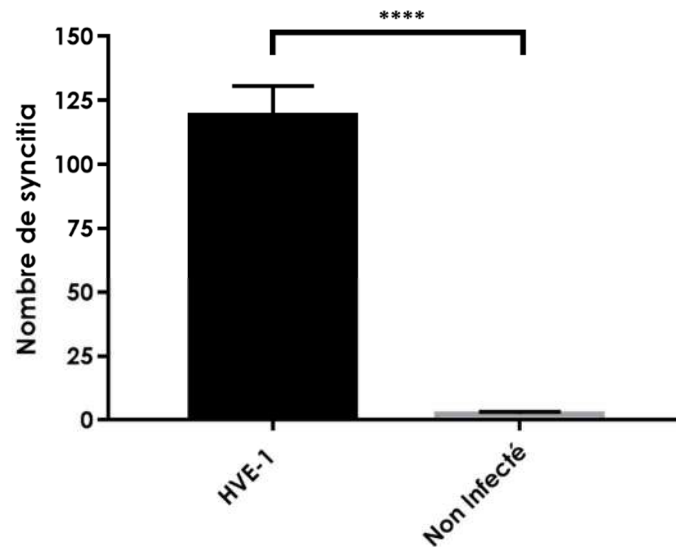


Figure 86. Quantification automatique des syncytia.

Graphique représentant la moyenne du nombre de syncytia mesuré par l'algorithme de quantification de l'ECP sur RK13 pour une condition infectée (HVE-1) et une condition non infectée. La quantification a été réalisée sur les triplicats d'une seule expérience indépendante. Les statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 7 à l'aide d'un test de student non apparié. ****: p-value < 0.0001.

Avec une moyenne de 119 syncytia pour la condition infectée et de 2 pour la condition non infectée, la différence obtenue est significative et démontre que cet algorithme permet de quantifier l'ECP d'HVE-1 sur cellules RK13 de manière précise et avec un bruit de fond très faible.

De plus, par le nombre restreint d'étapes et de paramètres analysés, l'acquisition des données est rapide et les résultats d'une plaque 96 puits sont ainsi obtenus en moins d'une heure, faisant de cet algorithme un outil prometteur pour l'identification de molécules antivirales lors de campagnes de criblage à haut contenu.

III.1.2 Identification de molécules antivirales et comparaison avec le criblage HVE-1 ANCHORGFP

Afin de déterminer la puissance de la quantification automatisée de l'effet cytopathique pour la découverte de molécules antivirales et son application pour le HCS, l'algorithme de quantification des syncytia a été appliqué sur les 16 plaques ayant servies au criblage primaire de l'HVE-1 ANCHORGFP.

III.1.2.1 Criblage primaire

Pour que les résultats puissent être comparés, l'identification des composés antiviraux à la suite de la quantification automatisée des syncytia a été réalisée selon le même schéma décisionnel que celui mis en place lors du criblage HVE-1 ANCHORGFP. Ainsi la première étape a été de sélectionner les composés dont l'activité est inférieure à la valeur de 3 écart-types (Figure 87).

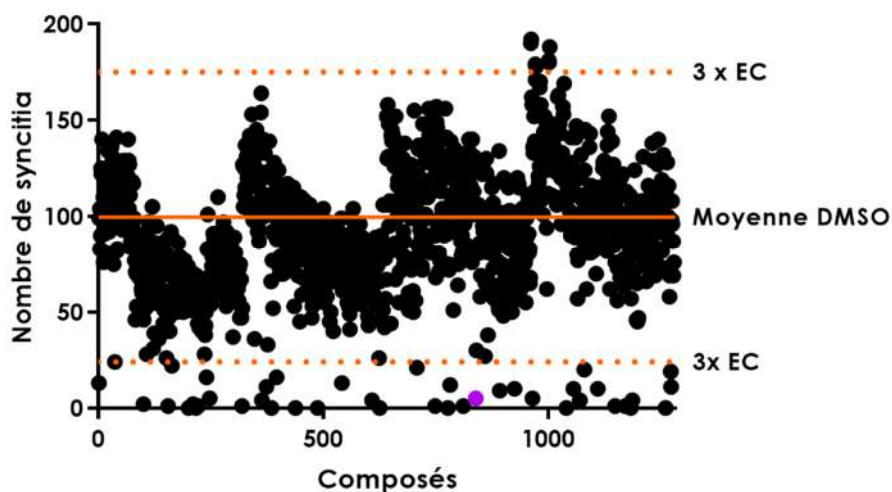


Figure 87. Résultats du criblage primaire par quantification automatisée des syncytia.

Graphique représentant le nombre de syncytia obtenus pour chacun des 1280 composés. La ligne orange correspond à la moyenne des valeurs DMSO pour l'ensemble des 16 plaques du criblage primaire. Les lignes en pointillés orange représentent la limite basse et haute de sélection des inhibiteurs et des activateurs et correspondent à 3x la valeur de l'écart-type obtenu pour les 16 plaques du criblage.

Violet : ganciclovir.

Comme pour la quantification d'HVE-1 ANCHORGFP, la majorité des composés se situent entre les limites de sélection et ne sont donc pas considérés comme inhibiteurs d'HVE-1.

Par contre, la répartition des composés n'est pas homogène entre les plaques et entraîne ainsi un écart-type important, expliquant la plus faible proportion de molécules inhibitrices identifiées par rapport au criblage auto-fluorescent (48 contre 89). Parmi ces composés, le ganciclovir a bien été identifié et démontre une activité antivirale de niveau équivalent à celui mesuré lors du criblage HVE-1 ANCHORGFP, laissant supposer que l'algorithme de détection des syncytia est un outil de quantification précis. Cependant, les composés semblent se répartir en 4 groupes distincts présentant tous la même tendance avec un nombre moyen de syncytia diminuant de gauche à droite. L'origine de cette répartition reste encore inconnue puisqu'elle

n'a pas été observée lors du criblage HVE-1 ANCHORGFP mais laisse supposer que la méthode de quantification des syncytia ou le protocole expérimental doivent être optimisés.

Tout comme précédemment, afin d'identifier les molécules induisant réellement une diminution de l'effet cytopathique, les composés cytotoxiques doivent être éliminés. Contrairement à l'algorithme de quantification de l'HVE-1 ANCHORGFP qui permet à la fois de quantifier l'activité antivirale et la cytotoxicité des composés, l'algorithme de quantification automatisée des syncytia ne permet pas de quantifier ces deux paramètres simultanément. Ainsi, les plaques doivent être analysées une deuxième fois avec un algorithme permettant l'identification et la quantification de toutes les cellules, qu'elles soient isolées ou incluses dans un syncytium. Cependant, comme les valeurs de cytotoxicité ont été déterminées lors du criblage HVE-1 ANCHORGFP, la cytotoxicité des 48 composés identifiés par l'algorithme de quantification des syncytia était déjà connue, et 27 d'entre eux sont cytotoxiques.

A la suite de la quantification automatisée des syncytia, seuls 21 composés peuvent donc être considérés comme inhibiteurs d'HVE-1 et induisent tous une diminution de plus de 40% du nombre de syncytia (Figure 88) (Annexe 5).

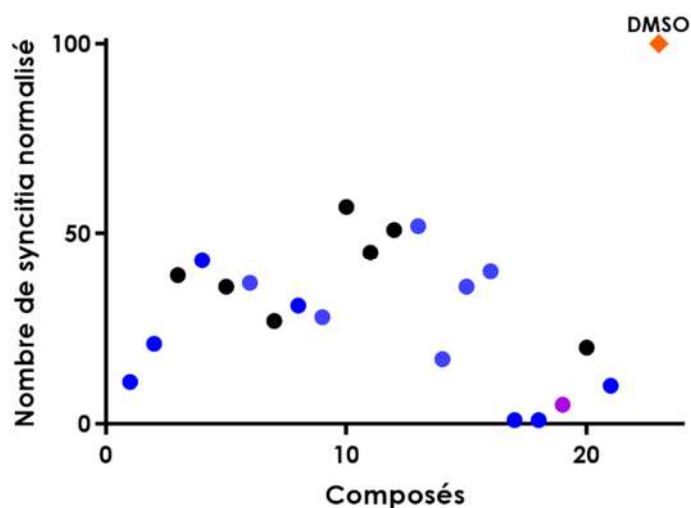


Figure 88. Activité antivirale des composés sélectionnés suite à la quantification automatisée des syncytia.

Graphique représentant le nombre de syncytia normalisés des 21 composés sélectionnés pour leur activité antivirale contre HVE-1 par la quantification automatisée de l'effet cytopathique en cellules RK13. Losange orange : contrôle DMSO. Violet : ganciclovir. Bleu : composés antiviraux dont l'activité a été également démontrée lors du criblage HVE-1 ANCHORGFP.

Parmi ces 21 composés, 14 sont communs entre les deux techniques de quantification, dont 11 ont été sélectionnés pour la deuxième phase de criblage HVE-1 ANCHORGFP signifiant ainsi que la quantification automatisée des syncytia est capable d'identifier des molécules antivirales. De plus, pour la plupart de ces composés l'activité antivirale observée est d'un niveau équivalent à celle obtenue lors de la quantification d'HVE-1 ANCHORGFP, confirmant la précision de l'algorithme de quantification automatique des syncytia pour caractériser la puissance d'une molécule antivirale (Annexes 1 et 5).

Cependant, le Z' factor moyen obtenu pour cette méthode de quantification est de 0,36 et est donc assez faible (Figure 89).

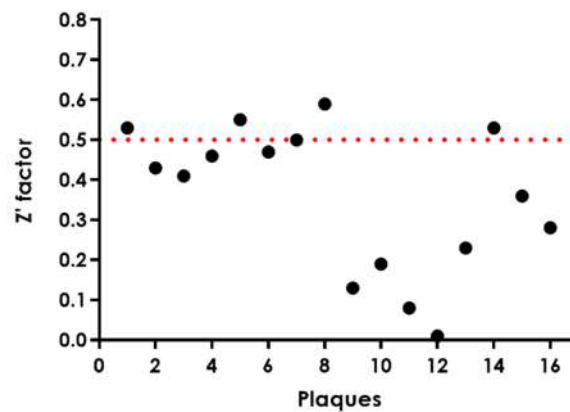


Figure 89. Z' factor obtenus pour la quantification automatique des syncytia.

Graphique représentant le Z' factor pour chaque plaque du criblage primaire. La ligne rouge en pointillés représente la valeur de 0,5 à partir de laquelle le criblage est considéré comme excellent.

Ainsi, seules 4 plaques présentent un Z' factor excellent supérieur à 0,5. Cinq autres plaques possèdent un bon Z' factor dont la valeur est comprise entre 0,4 et 0,5, tandis que les autres ont un Z' factor inférieur à 0,4.

Cependant, les composés antiviraux identifiés par la quantification automatique des syncytia sont similaires à ceux découverts lors du criblage HVE-1 ANCHORGFP, laissant supposer que les faibles valeurs de Z' factor ne sont pas le résultat d'une mauvaise quantification mais pourraient plutôt être dues à un problème d'expérimentation, et qu'il est nécessaire d'optimiser les protocoles expérimentaux pour l'utilisation de cet algorithme.

III.1.2.2 Comparaison des fenêtres thérapeutiques

Après avoir démontré que la quantification automatisée de l'effet cytopathique peut identifier des molécules antivirales, il est maintenant nécessaire d'observer si elle peut être également utilisée pour de déterminer les fenêtres thérapeutiques et hiérarchiser les composés. Pour cela, l'IC50 des 10 composés dont la fenêtre thérapeutique a été déterminée dans le chapitre 5 a été mesurée une nouvelle fois en utilisant l'algorithme de quantification automatisée des syncytia (Tableau 20).

Composé	IC50 EXP1 (nM)	IC50 EXP2 (nM)	IC50 EXP3 (nM)	Moyenne ± EC (nM)	IC50 HVE1 ANCHORGFP (nM)
Azaguanine-8	208	528	541	426 ± 190	770 ± 490
Pyriméthamine	1 310	829	375	839 ± 470	1 420 ± 1 000
Thioguanosine	2 000	1 930	1 950	1 960 ± 4	3 190 ± 1280
Penciclovir	2 300	14 000	3 480	6 593 ± 6 440	4 560 ± 1 090
Monensine	559	1 540	1 680	1 260 ± 610	1 040 ± 510
Auranofine	409	1 800	722	977 ± 730	1 010 ± 520
Ganciclovir	106	1 390	536	680 ± 650	200 ± 30
Azacytidine-5	2 860	4 460	3 790	3 700 ± 800	3 820 ± 780
Flubendazole	306	3 170	10 500	4 660 ± 5 260	1 670 ± 340
Parbendazole	678	1 980	1 830	1 500 ± 710	1 760 ± 450

Tableau 20. IC50 obtenues par la quantification automatisée de l'effet cytopathique.

Les valeurs d'IC50 obtenues pour chaque expérience indépendante ont été calculées à l'aide du logiciel CombeneFit à partir de triplicats et sont exprimées en nM. EXP : expérience. EC : écart-type.

Les IC50 obtenues par la quantification automatisée des syncytia sont, pour la plupart, proches de celles obtenues par la quantification de la fluorescence d'HVE-1 ANCHORGFP, confirmant que cet algorithme de quantification est une nouvelle méthode précise d'identification et de caractérisation des molécules antivirales.

Les CC50 étant identiques à celles obtenues lors du criblage du HVE-1 fluorescent, les fenêtres thérapeutiques obtenues par la quantification de l'effet cytopathique sont donc similaires entre les deux techniques de quantification (Tableau 21).

Composé	CC50	IC50 ECP	SI ECP	SI HVE1 ANCHORGFP
Azaguanine-8	4 410	426	10,35	5,72
Pyriméthamine	5 280	839	6,94	3,72
Thioguanosine	3 850	1 960	1,96	1,21
Penciclovir	>20 000	6 593	>3,03	>4,39
Monensine	>20 000	1 260	>15,87	>19,23
Auranofine	3 440	977	3,52	3,41
Ganciclovir	>20 000	680	>30	>100
Azacytidine-5	16 370	3 700	4,42	4,28
Flubendazole	2 160	4 660	0,46	1,29
Parbendazole	4 110	1 500	2,72	2,33

Tableau 21. Fenêtres thérapeutiques obtenues par quantification automatisée des syncytia.

Les valeurs de CC50 et d'IC50 correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes et sont exprimées en nM.

Pour certains composés, la fenêtre thérapeutique à l'air plus intéressante par la quantification automatisée des syncytia, mais cela ne peut pas être considéré comme différent puisque la détermination de la fenêtre thérapeutique ne prend pas en compte l'écart-type. Ainsi, les résultats obtenus par cette quantification sont en corrélation avec ceux précédemment décrits pour HVE-1 ANCHORGFP puisque le ganciclovir et la monensine constituent également les composés les plus intéressants et que la thioguanosine, le flubendazole et le parbendazole présentent de faibles fenêtres thérapeutiques.

III.1.3 Précision de la quantification automatisée des syncytia

Pour terminer la caractérisation de cette nouvelle méthode de quantification, une étude comparative des IC50 du ganciclovir obtenues par l'algorithme de quantification, l'HVE-1 ANCHORGFP et par qPCR a également été réalisée (Figure 90).

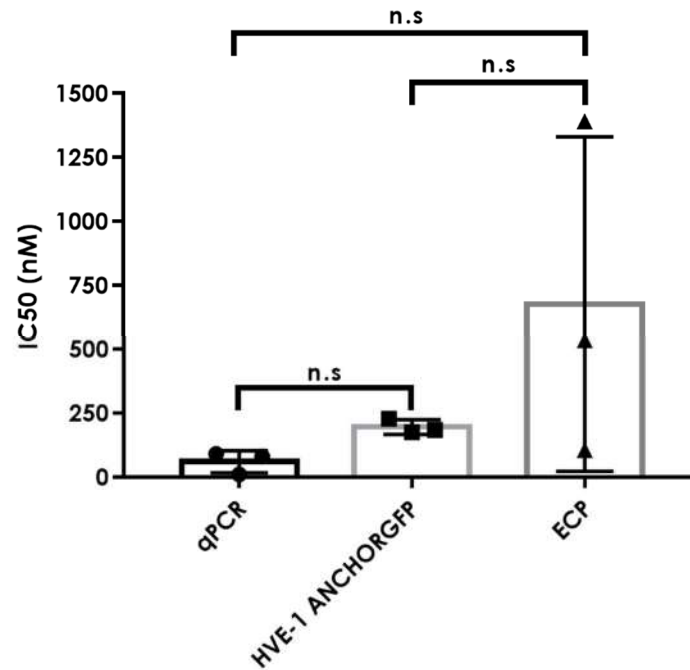


Figure 90. Comparaison des IC50 du ganciclovir obtenues par quantification qPCR, HVE-1 ANCHORGFP et effet cytopathique.

Graphique représentant l'IC50 moyenne obtenue pour le ganciclovir selon différentes techniques de quantification. Les valeurs correspondent à la moyenne des IC50 obtenues pour trois expériences indépendantes. Chaque point représente l'IC50 d'une expérience. Un test One-way Anova avec comparaisons multiples a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prism 7. n.s : non significatif.

Quelle que soit la méthode de quantification utilisée, l'IC50 obtenue se situe sous le micromolaire et les variations observées ne sont pas significatives, ce qui démontre que l'HVE-1 ANCHORGFP et la quantification automatisée des syncytia ont une précision similaire à celle de la qPCR.

Cependant, la variation des IC50 entre les expériences indépendantes est plus grande pour la quantification automatisée de l'effet cytopathique par rapport aux deux autres techniques de quantification, laissant supposer que cette méthode pourrait être optimisée.

III.2 Développement d'une quantification automatisée des cellules rondes sur cellules ED

Après avoir mis en place une quantification automatisée des syncytia sur le modèle cellulaire RK13, et pour proposer un modèle de quantification applicable à d'autres phénotypes d'effet cytopathique, un algorithme de quantification spécifique a été développé afin de quantifier l'ECP d'HVE-1 en cellules équines.

Comme évoqué dans le chapitre 4, les passages successifs d'HVE-1 ANCHORGFP sur RK13 ont favorisé l'adaptation de ce virus recombinant pour l'infection des cellules RK13, et l'infection des cellules ED par HVE-1 ANCHORGFP, bien que possible, doit être réalisée avec une forte MOI. De ce fait, et pour éviter que cette forte MOI n'impacte les résultats, la mise au point de l'algorithme de quantification de l'effet cytopathique sur ED a été effectuée avec le virus parental HVE-1 WT.

III.2.1 Algorithme de quantification

L'infection de cellules équines par HVE-1, et plus précisément les cellules ED, induit un effet cytopathique typique rencontré chez de nombreux herpèsvirus et caractérisé par l'arrondissement des cellules.

Contrairement aux cellules RK13 pour lesquelles le microscope n'arrivait pas à différencier les amas cellulaires des syncytia en lumière transmise, les cellules ED non infectées présentent un phénotype de cellules fibroblastiques classique et sont de forme plutôt allongée, par rapport aux cellules infectées rondes. De ce fait, en lumière transmise, les cellules infectées ne sont pas localisées sur le même plan 3D que les cellules non infectées et il est ainsi possible de mettre en relief les cellules de forme arrondie en réalisant la mise au point du microscope non sur le tapis cellulaire, comme fait habituellement, mais sur les cellules rondes. De cette façon, les cellules rondes présentent un contour bien délimité et d'intensité supérieure à celui des cellules non infectées. Fondé sur ce principe, en sélectionnant les objets grâce à leur intensité en lumière transmise, l'algorithme de quantification est capable de délimiter les cellules de forme arrondies (Figure 91).

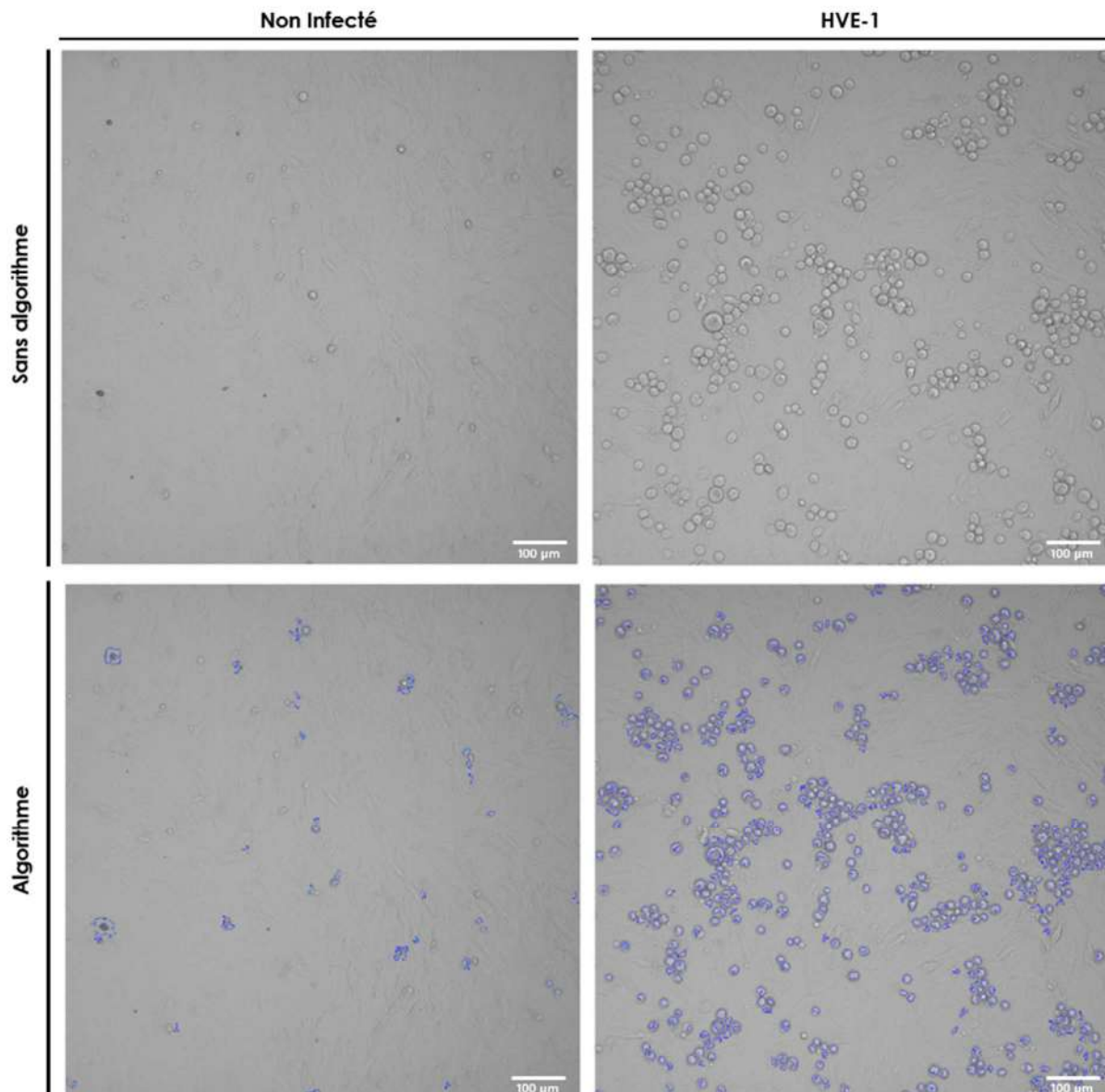


Figure 91. Algorithme de quantification des cellules rondes.

L'algorithme de quantification des cellules rondes est représenté en bleu. Les images ont été obtenues avec le CX7, objectif 10x et représentent un seul champ d'acquisition. Barre d'échelle = 100 µm.

L'algorithme se juxtapose bien aux cellules rondes et permet ainsi de marquer l'effet cytopathique induit par l'infection à HVE-1. Cependant, il n'est pas possible de faire la distinction entre une cellule ronde infectée et une cellule ronde en état de mort cellulaire ou en mitose.

De ce fait, un léger bruit de fond est identifié dans la condition non infectée. Pour vérifier que le bruit de fond est résiduel et que la différence entre les deux conditions est bien visible, une analyse du nombre d'objets a été réalisée en triplicat (Figure 92).

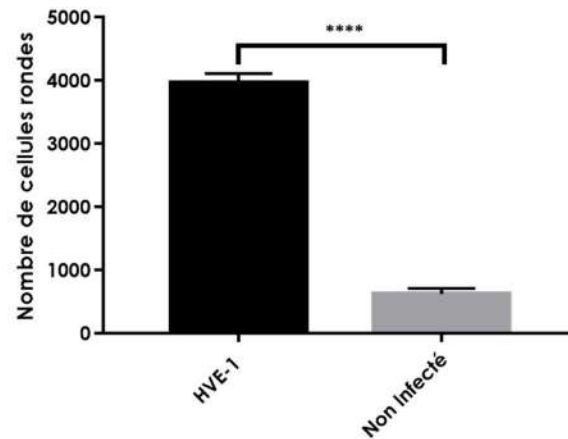


Figure 92. Quantification automatisée des cellules rondes.

Graphique représentant le nombre de cellules rondes mesuré par l'algorithme de quantification de l'ECP sur ED pour une condition infectée (HVE-1) et une condition non infectée. La quantification a été réalisée sur les triplicats d'une seule expérience indépendante. Les statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism à l'aide d'un test de student non apparié. ****: p-value < 0.0001.

Le nombre de cellules rondes est ainsi beaucoup plus important dans la condition infectée par HVE-1 par rapport à la condition non infectée, et la différence entre les deux est significative. L'algorithme de mesure des cellules rondes peut donc être utilisé pour quantifier l'effet cytopathique d'HVE-1 sur cellules ED.

De plus, par la quantification directe sur lumière transmise, la fixation des cellules et le marquage nucléaire ne sont pas nécessaires, permettant ainsi de quantifier la formation de l'effet cytopathique en temps réel (Figure 93).

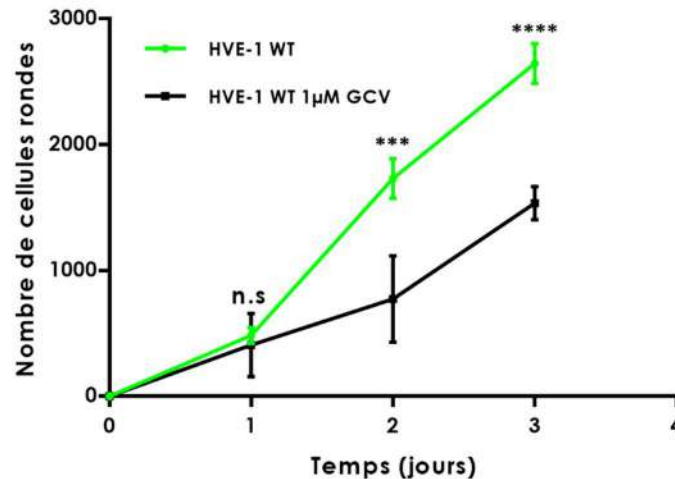


Figure 93. Quantification en temps réel du nombre de cellule rondes.

Des cellules ED ont été traitées (noir) ou non (vert) avec 1µM de ganciclovir (GCV) et infectées avec HVE-1 WT à MOI 0,08. Le nombre de cellules rondes a été quantifié quotidiennement à l'aide du CX7. Le graphe représente la moyenne et l'écart-type d'une seule expérience réalisée en triplicats. Les statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 7 à l'aide d'un test de student non apparié. n.s : non significatif. *** : p-value = 0,0001. ****: p-value < 0,0001.

Le nombre d'objets augmente de manière exponentielle au cours du temps lorsque les cellules sont infectées par HVE-1 WT, confirmant que cet algorithme permet de quantifier l'effet cytopathique en temps réel. De plus, lorsque les cellules ont été traitées avec du ganciclovir, l'augmentation du nombre de cellules rondes est beaucoup moins forte et la différence significative entre les deux conditions s'agrandit, grâce à l'activité antivirale du traitement, supposant ainsi que cette nouvelle méthode de quantification pourrait être efficace pour l'identification de molécules antivirales en temps réel dans les cellules vivantes.

Cependant, par la faible vitesse de croissance et de division des cellules ED, l'amplification de ces cellules en quantité suffisante pour une campagne de criblage à haut débit est longue et nécessite beaucoup de consommables. Par conséquent, les capacités de cet algorithme de quantification n'ont pas été testées lors d'un criblage à haut contenu. Pour tester l'efficacité de cette nouvelle méthode de quantification, 3 composés ont été utilisés : le traitement de référence ganciclovir, le LB56 qui a démontré une très bonne activité antivirale sur cellules RK13, et le LAVR289 dont l'action devait être testée sur un autre type cellulaire.

III.2.2 Activité antivirale du ganciclovir, LAVR289 et LB56 sur ED

Les cellules ED ont ainsi été traitées avec des concentrations de ganciclovir, LAVR289 ou LB56 allant de 10 μ M à 0,001 μ M (dilution de raison 10) et infectées avec l'HVE-WT à MOI 0,08 et les IC₅₀ ont été calculées comme décrit précédemment (Figure 94).

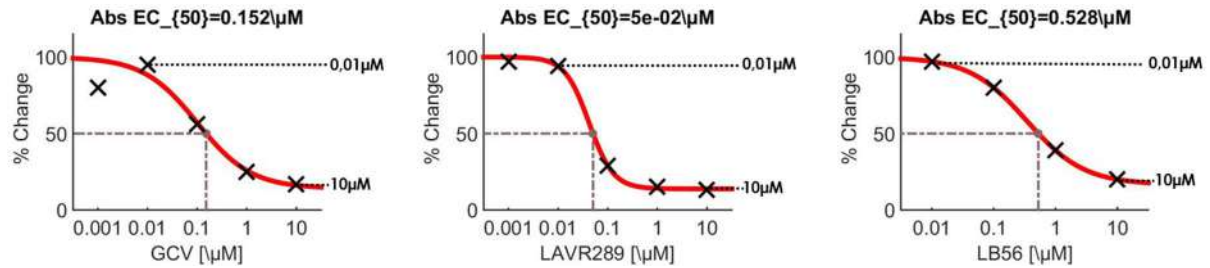


Figure 94. IC₅₀ obtenues par la quantification des cellules rondes.

Graphiques représentant les courbes ayant servies pour le calcul de l'IC₅₀ par le logiciel Combenefit. Les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées à partir de la moyenne des triplicats d'une seule expérience.

Ainsi, les trois composés testés induisent une forte diminution du nombre de cellules rondes de manière dose dépendante et ont une forte activité antivirale contre HVE-1 sur cellules ED. Le ganciclovir et le LB56 possèdent une activité antivirale semblable à celle mesurée sur cellules RK13, ce qui confirme que l'algorithme de quantification des cellules rondes est capable d'identifier et de caractériser des molécules antivirales. Le LAVR289, quant à lui, présente une IC₅₀ très intéressante puisque inférieure à celle du ganciclovir, et démontre ainsi une très bonne activité antivirale sur le modèle ED.

Afin d'observer si le LAV289 et le LB56 pourraient constituer de nouvelles perspectives de traitement, leur cytotoxicité a également été déterminée sur cellules ED (Figure 95).

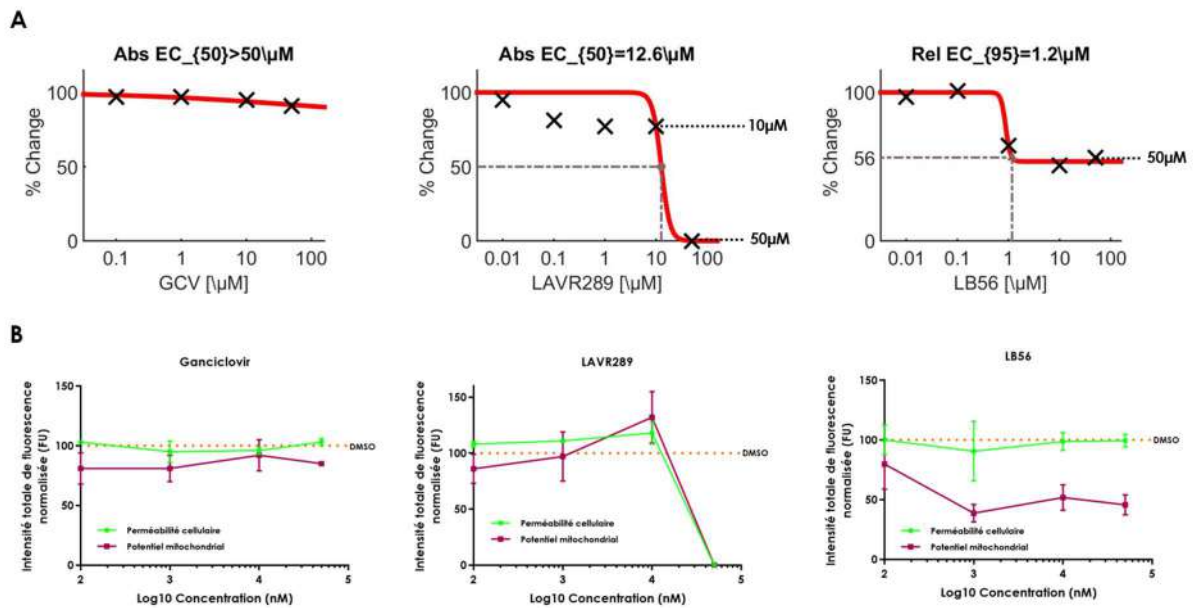


Figure 95. Détermination des CC50 et mesure de la cytotoxicité du ganciclovir, LAVR289 et LB56 sur ED.

A. Courbes utilisées par le logiciel Combobenefit pour déterminer la CC50 des composés. Les valeurs de CC50 sont exprimées en μM. « % change » correspond au paramètre analysé, ici le nombre total de cellules. Abs EC₅₀ : concentration efficace 50. Rel EC : concentration efficace relative. B. Graphiques représentant la perméabilité cellulaire et le potentiel mitochondrial, tous deux exprimés en unité de fluorescence et normalisés sur les valeurs contrôles DMSO, selon la concentration de composé. Les concentrations sont représentées en logarithme de 10 et exprimées en nM. Les données correspondent à la moyenne et l'écart-type des triplicats d'une seule expérience.

Comme attendu le ganciclovir ne présente pas de cytotoxicité sur les cellules ED. Le LAVR289 possède une CC50 similaire à celle obtenue sur cellules RK13 et est cytotoxique à partir de 12 μM. Comme la valeur normalisée du nombre total de cellules n'atteint pas le seuil de 50%, la CC50 du LB56 n'a pas pu être déterminée par le logiciel. Ainsi, le logiciel a calculé une concentration relative pour laquelle le LB56 induit une diminution de 45% du nombre de cellules. Cette limite est atteinte pour une concentration de 1,2 μM est en corrélation avec la forte diminution du potentiel mitochondrial observé à partir 1 μM. De ce fait, la valeur de 1,2 μM a été considérée comme valeur de CC50 pour déterminer la fenêtre thérapeutique minimale du LB56 (Tableau 22).

Composé	CC50 (nM)	IC50 (nM)	SI
Ganciclovir	>50 000	152	> 329
LAVR289	12 600	50	252
LB56	>1 200	528	> 2,27

Tableau 22. Fenêtres thérapeutiques du ganciclovir, LAVR289 et LB56 sur ED.

Les valeurs de CC50 et d'IC50 correspondent à la moyenne des triplicats d'une seule expérience et sont exprimées en nM. La fenêtre thérapeutique (SI) a été déterminée par le rapport CC50 / IC50.

Sans surprise, par son absence de cytotoxicité *in vitro*, le ganciclovir possède une excellente fenêtre thérapeutique qui est même supérieure à celle mesurée sur cellules RK13.

Par contre, en ce qui concerne le LAVR289 et le LB56, des résultats inverses à ceux observés sur cellules RK13 sont obtenus sur cellules ED. En effet, le LB56 qui révélait une fenêtre thérapeutique de 17,25 sur cellules de lapin présente ici une faible fenêtre thérapeutique due à sa forte cytotoxicité. Cependant, comme la CC50 du LB56 n'a pas pu être déterminée, la fenêtre thérapeutique présentée ici est minimale et ne correspond pas forcément à la fenêtre thérapeutique réelle de ce composé. En revanche, le LAVR289 qui démontrait une faible fenêtre thérapeutique due à son absence d'activité antivirale sur cellules RK13 révèle une meilleure efficacité que le ganciclovir contre HVE-1, et une cytotoxicité modérée. De ce fait, la fenêtre thérapeutique du LAVR289 sur cellules ED dépasse les 250, faisant ainsi de cette molécule une très bonne candidate pour l'élaboration de nouveaux traitements anti-HVE-1.

III.2.3 Précision de l'algorithme de quantification des cellules rondes

Comme pour l'algorithme de quantification automatisée des syncytia, la moyenne des IC50 du ganciclovir obtenues par qPCR ou par la quantification automatique des cellules rondes a été comparée (Figure 96).

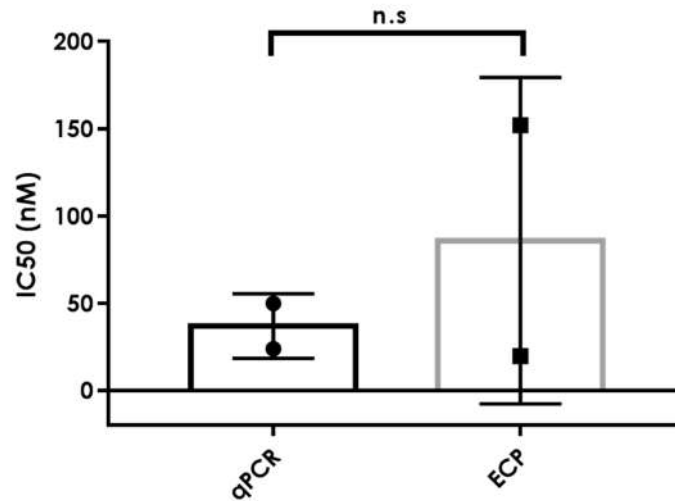


Figure 96. Comparaison des IC50 obtenues par qPCR et par quantification des cellules rondes.

Graphique représentant l'IC50 moyenne obtenue pour le ganciclovir selon différentes techniques de quantification pour deux expériences indépendantes. Chaque point représente l'IC50 d'une expérience. Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 7 à l'aide d'un test de student non apparié. n.s. : non significatif.

La différence entre les deux méthodes de quantification n'est pas significative, ce qui démontre que l'algorithme de mesure des cellules rondes est un nouvel outil de quantification dont la précision se rapproche des techniques de quantification couramment utilisées. Cependant, l'écart-type obtenu pour la quantification de l'effet cytopathique est important, laissant supposer que l'algorithme pourrait être optimisé, même si cette variation est accentuée par les faibles valeurs d'IC50.

IV. Discussion

Afin d'apporter de nouveaux outils d'identification de molécules antivirales, il est nécessaire de développer des techniques de quantification faciles à mettre en place et permettant de tester de nombreuses molécules.

Dans cette optique, les capacités d'analyses de notre microscope à haut contenu CX7 ont été mises à profit afin d'essayer d'automatiser la quantification de l'effet cytopathique. Bien que possédant un grand nombre d'options paramétrables, la nécessité de définir une bio-application confère une certaine rigidité au système de détection du CX7 empêchant ainsi certaines mesures, comme la simple identification des syncytia en lumière transmise, et rendant compliquée la quantification de l'effet cytopathique.

Après quelques essais infructueux, un algorithme permettant la quantification automatisée des syncytia à partir du marquage nucléaire a été développé et démontre des aptitudes pour le criblage à haut contenu, notamment par sa rapidité d'analyse.

La précision des résultats obtenus avec cet algorithme de quantification de l'effet cytopathique a été comparée aux résultats du criblage HVE-1 ANCHORGFP. Soixante-sept pourcents des composés identifiés par la quantification de l'effet cytopathique ont également été identifiés lors du criblage du virus recombinant, révélant ainsi que la quantification automatisée des syncytia est un nouvel outil très intéressant pour la découverte de molécules antivirales. Les deux méthodes ne quantifiant pas le même paramètre, il était attendu que les composés identifiés ne soient pas totalement identiques. En effet, alors que l'HVE-1 ANCHORGFP permet d'étudier l'infection et la réplication virale, étapes précoces, la quantification automatisée de l'ECP observe le phénotype terminal du cycle viral. Ainsi, il est possible que les 7 composés antiviraux uniquement identifiés par l'analyse de l'effet cytopathique agissent sur les étapes tardives du cycle de réplication, telle que la maturation ou la transmission des nouvelles particules virales et la formation des syncytia, et n'aient donc pas d'effet sur l'infection ou la réplication.

De plus, cette mesure se montre également précise dans la détermination de l'activité antivirale en permettant notamment d'obtenir des valeurs d'IC50 proches de cellules obtenues avec le virus recombinant ou la qPCR.

Cependant, même si cet algorithme est prometteur, certains résultats laissent penser que cette nouvelle méthode de quantification doit encore être optimisée. En effet, dû à un Z' factor inférieur à 0,5, les résultats du criblage primaire obtenus par quantification des syncytia sont

marginiaux alors que le Z' factor de toutes les plaques était supérieur à 0,5 lors de la quantification de la fluorescence. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que les banques utilisées pour le HCS sont formatées de telle sorte que les puits contrôles se situent aux deux extrémités de la plaque (colonne 1 et 12), et sont donc soumis à un fort effet de bord [338]. Lors de l'analyse du criblage primaire par la quantification automatisée de l'effet cytopathique, il a été remarqué un écart-type assez important pour l'ensemble des résultats ainsi qu'une répartition non homogène des composés inactifs. Pour la plupart des plaques, l'état d'avancement de l'effet cytopathique n'était pas similaire selon l'extrémité considérée alors qu'aucune différence ne fut observée lors de la quantification du taux d'infection ou de réplication d'HVE-1 ANCHORGFP. Le plus souvent, la colonne 1 présentait de larges syncytia tandis que le tapis cellulaire de la colonne 12 à l'opposé était parsemé de plages de lyse (trous), témoignant de la lyse des cellules, et renfermait donc moins de syncytia, pouvant ainsi entraîner une grande variabilité dans les valeurs contrôles et de fait un mauvais Z' factor.

Cependant, l'effet de bord ne peut pas à lui seul être la cause des résultats différents obtenus entre la quantification automatisée de l'ECP et la quantification de la fluorescence. Une autre explication pourrait être que, pour que la comparaison entre les deux méthodes de quantification soit cohérente, la quantification des syncytia a été réalisée sur les plaques du criblage HVE-1 ANCHORGFP. De ce fait, ces plaques ont été préparées selon des conditions d'ensemencement et d'infection optimisées pour la quantification de HVE-1 ANCHORGFP. En effet, dans ces conditions les cellules RK13 non infectées ou traitées avec des antiviraux puissants tels que le ganciclovir sont à confluence lors de l'analyse, pouvant ainsi entraîner une formation plus importante d'amas cellulaire et ainsi un bruit de fond plus important pour la quantification automatisée des syncytia et la sélection de faux positifs. Il serait ainsi intéressant de définir les conditions d'ensemencement et d'infection adéquates pour la quantification automatisée des syncytia pour optimiser cette nouvelle méthode de quantification et en faire un nouvel atout pour la recherche de molécules antivirales.

Afin de pouvoir proposer une quantification automatisée d'HVE-1 sur différents types cellulaires, un algorithme de quantification de l'effet cytopathique sur cellules équines a été mis en place et consiste en la quantification des cellules arrondies.

Un des principaux avantages de cet algorithme est qu'il permet une quantification directe de l'effet cytopathique en lumière transmise et ne nécessite donc pas la fixation et le marquage des cellules. Il pourrait ainsi constituer un nouvel outil très intéressant pour des études de cinétique virale et de mécanismes d'action.

En plus de la quantification en temps réel, cet algorithme permet une quantification précise de l'activité antivirale et a permis de révéler l'excellente activité antivirale du LAVR289 contre HVE-1, positionnant ainsi cette molécule en tête de tous les composés testés dans cette thèse.

En raison des difficultés à cultiver les cellules ED, et les conséquences de l'épidémie de COVID19 sur l'approvisionnement en consommables des laboratoires, certaines expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois, et les résultats obtenus nécessitent d'être répétés afin de pouvoir confirmer les effets observés. De plus, il serait également intéressant de tester les capacités de cet algorithme de quantification pour le criblage à haut contenu.

Cependant, même si des étapes d'optimisation sont encore nécessaires, les résultats obtenus avec ces deux méthodes de quantification de l'effet cytopathique sont encourageants et pourraient peut-être apporter de nouvelles perspectives pour le développement de la recherche antivirale.

Chapitre 7.

Conclusions générales et perspectives

Les virus sont des parasites intracellulaires très prévalents dans le monde et peuvent affecter à la fois humains et animaux. Cependant, alors que la recherche de traitements pour les maladies virales humaines est bien développée et a permis la mise sur le marché de nombreuses molécules, la recherche antivirale vétérinaire n'a pas connu la même expansion.

Pourtant, par le fort impact qu'ils peuvent avoir sur l'industrie et l'économie d'un pays, ou même sur la santé humaine, il est important de poursuivre l'étude de ces virus animaux et de trouver des nouvelles molécules antivirales, afin de proposer des traitements plus adaptés aux animaux et de pouvoir rapidement limiter l'impact d'épizooties ou de maladies virales zoonotiques.

Cependant, par la difficulté d'utiliser les techniques de quantification actuelles à haut contenu ou à haut débit, il est nécessaire de développer de nouveaux outils permettant, à la fois, l'étude et la quantification de processus viraux, et dont la mise en œuvre et les coûts associés seraient abordables, afin d'identifier rapidement de nouveaux composés antiviraux.

Dans ce but, cette thèse CIFRE a été mise en place entre l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) et l'entreprise NeoVirTech, propriétaire d'une nouvelle technologie de visualisation de l'ADN et spécialisée dans la découverte de molécules antivirales.

Le principal objectif de cette thèse était donc d'insérer la technologie ANCHOR™ à l'intérieur du génome viral d'un ou de plusieurs alphaherpèsvirus, une des sous-familles virales les plus prévalentes dans le monde animal et représentant une menace majeure pour les animaux domestiques et la faune sauvage.

Pour cela, et afin de permettre une insertion rapide du système ANCHOR™ au sein de plusieurs génomes viraux, une stratégie de clonage *in silico* a été réalisée afin de permettre le développement d'un plasmide de pré-transfert dont seules les zones d'homologies auraient à être insérées, et qui pourrait notamment être utilisée pour marquer l'herpèsvirus équin de type 1, l'herpèsvirus félin de type 1, l'herpèsvirus de faucon ou encore l'herpèsvirus de tortue TeHV-3. La mise en pratique de cette stratégie de clonage a ainsi permis d'obtenir un plasmide de pré-transfert appelé pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP après trois étapes de clonage successives.

Ce plasmide contient le système ANCHOR™ dans son intégralité, pour le marquage de l'ADN viral, le gène de sélection *eco.gpt* sous la dépendance du promoteur pCMV, pour faciliter la sélection des virus recombinants, ainsi que 4 sites de restriction spécifiques pour l'insertion des zones d'homologie.

Grâce à cette stratégie et ce plasmide de pré-transfert, seules deux étapes sont désormais nécessaires pour l'obtention d'un plasmide de transfert, ce qui permet d'accélérer le développement de virus recombinants et les coûts de développement associés, puisque seules des amorces pour l'amplification des zones d'homologie sont nécessaires. Ainsi, ce plasmide de pré-transfert pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP pourrait être un nouvel outil très intéressant pour le développement de nouveaux virus ANCHORGFP et ainsi constituer le point de départ d'études des mécanismes d'infection et de réplication de nombreux virus à ADN.

Ce plasmide de pré-transfert a ensuite servi de base pour l'insertion des gènes ORF14 et ORF13 de l'herpèsvirus équin de type 1 et le développement du plasmide de transfert pUC19HVE1ANCHORGFP, dont l'utilisation au cours d'une expérience de recombinaison homologue a permis l'obtention d'un HVE-1 recombinant auto-fluorescent ANCHORGFP.

Après purification, production et caractérisation, ce virus recombinant a ainsi été utilisé pour observer l'infection d'HVE-1 en cellules vivantes et a permis de visualiser pour la première fois la réplication et les centres réplicatifs d'HVE-1 dans les cellules RK13 et ED, et de montrer que la réplication était maintenue à l'intérieur des syncytia. Cependant, afin d'apporter des précisions sur le déroulement du cycle viral et la transmission des particules, il serait intéressant de réaliser une expérience de suivi de l'infection en temps réel pour visualiser la totalité du cycle d'HVE-1 et observer en direct la formation des centres réplicatifs, des syncytia et la lyse cellulaire.

Bien que les études fondamentales n'aient pas été plus approfondies dans ces travaux, l'HVE-1 ANCHORGFP s'est révélé être un outil très intéressant pour l'étude du cycle viral d'HVE-1, et la collaboration avec d'autres laboratoires pourraient permettre d'apporter de nouvelles connaissances et d'accélérer la compréhension des mécanismes d'infection et de réplication de l'herpèsvirus équin de type 1.

Après avoir développé ce virus recombinant HVE-1 ANCHORGFP, le deuxième objectif de ce projet était d'identifier des molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin de type 1, puisque, jusqu'ici, seuls des antiviraux destinés à traiter les infections humaines et non adaptés au traitement des gros animaux sont utilisés.

Pour répondre à cette problématique, l'HVE-1 ANCHORGFP a été utilisé dans une campagne de criblage à haut contenu de 1280 composés testés à faible concentration afin d'identifier des antiviraux puissants pouvant être compatibles avec le traitement d'un animal de poids conséquent. Lors de cette campagne de HCS, l'HVE-1 ANCHORGFP s'est révélé être un outil très performant pour l'identification et la caractérisation des molécules antivirales, avec une précision proche de celle de la qPCR. Ainsi, 18 composés ont démontré une forte activité antivirale contre HVE-1 en réduisant de plus de 40% le taux d'infection et le taux de réplication de l'HVE-1 ANCHORGFP. Parmi ces 18 composés, 8 d'entre eux ont confirmé leur activité antivirale, et leur intérêt comme potentiel traitement a été déterminé par le calcul de la fenêtre thérapeutique. Malheureusement, mis à part le traitement de référence ganciclovir et la monensine, qui est toxique chez le cheval, la plupart des composés présentent une forte cytotoxicité sur le modèle cellulaire RK13 et possèdent donc une faible fenêtre thérapeutique, non compatible avec une utilisation en clinique. Cependant, la cytotoxicité de ces composés n'a été étudiée que sur un seul modèle cellulaire (RK13), qui, même si elles sont permissives à HVE-1 et permettent une bonne identification de l'activité antivirale, ne représentent pas l'espèce cible. Ainsi, il serait maintenant intéressant de tester la cytotoxicité de ces composés sur la lignée cellulaire ED afin d'observer si ces molécules sont définitivement cytotoxiques ou si la cytotoxicité observée est spécifique aux cellules RK13. Selon leur cytotoxicité sur cellules équine, la fenêtre thérapeutique de certains composés pourrait être différente, et devenir compatible avec des tests en cliniques ou des études de cytotoxicité *in vivo*.

Bien qu'aucune solution thérapeutique ne ressorte du criblage de la chimiothèque Prestwick, l'HVE-1 ANCHORGFP est un outil très intéressant pour la découverte de nouvelles molécules antivirales. En effet, par sa facilité d'utilisation, le criblage de composés sur l'HVE-1 ANCHORGFP ne nécessite que peu de consommables et a donc un coût abordable. De plus, par la quantification de la fluorescence, l'utilisation de l'HVE-1 ANCHORGFP est totalement compatible avec le HCS et permet d'obtenir rapidement des données quantitatives multi-paramétriques relatives à l'infection et à la réplication virale sans aucune étape d'extraction, et avec une précision similaire aux techniques de quantification couramment utilisées. Par conséquent, l'HVE-1 ANCHORGFP développé dans ces travaux de thèse représente un outil de quantification robuste et précis, dont l'utilisation pourrait permettre d'identifier rapidement de futurs traitements et ainsi accélérer la lutte contre la rhinopneumonie pour faire face aux différentes épizooties, telle que celle que connaît l'Europe au moment où ces lignes sont écrites.

L'utilisation du plasmide de pré-transfert pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP pour le développement d'autres alphaherpèsvirus ANCHORGFP, notamment ceux pour lesquels la stratégie de clonage a déjà été définie, pourrait permettre de mieux caractériser les alphaherpèsvirus et de mettre en lumière l'activité antivirale de nouveaux composés, voire de découvrir un antiviral à large spectre, et de faire ainsi avancer la recherche antivirale vétérinaire.

Bien que les virus ANCHORGFP représentent des outils très intéressants pour la recherche antivirale et la compréhension des mécanismes virologiques, et que le plasmide pUC19 pCMV E.GPT ANCHORGFP développé dans ces travaux permet d'obtenir plus rapidement un plasmide de transfert, les expériences de recombinaison homologues peuvent parfois être longues et retarder l'obtention des virus recombinants. De ce fait, il est également nécessaire de développer des outils de quantification de processus virologiques qui ne nécessiteraient pas l'insertion d'un système rapporteur et qui pourraient être rapidement mis en œuvre lors de campagne de criblage à haut contenu.

Pour répondre à ce troisième objectif, des algorithmes de quantification de l'effet cytopathique d'HVE-1 sur cellules RK13 et sur cellules ED ont ainsi été développés et quantifient respectivement le nombre de syncytia et le nombre de cellules rondes.

Même si ces deux algorithmes nécessitent quelques étapes d'optimisation, ces nouvelles méthodes de quantification se sont révélées efficaces pour identifier et caractériser des molécules antivirales, démontré notamment par l'étude comparative des résultats obtenus par la quantification automatisée des syncytia et la quantification de HVE-1 ANCHORGFP. De plus, ces deux algorithmes de quantification automatique de l'effet cytopathique ont démontré une précision proche de celle de la qPCR, prouvant l'efficacité de ces nouvelles méthodes pour la découverte de molécules antivirales.

Tout comme l'HVE-1 ANCHORGFP, la quantification automatique de l'effet cytopathique est une technique qui mesure un processus viral dont le prix est abordable et qui est facile à mettre en œuvre. De plus, par la rapidité d'obtention et la précision des résultats obtenus, cette nouvelle méthode de quantification possède de nombreux atouts pour l'identification de molécules antivirales lors de campagnes de criblage à haut contenu / débit, sachant qu'elle peut être adaptée à tout virus produisant un effet cytopathique visible, et peut donc être appliquée à de nombreux virus.

Enfin, comme cette méthode de quantification ne nécessite ni système rapporteur, ni extraction d'ADN, sa mise en place n'est pas soumise à l'obtention de données génomiques, et peut donc

être utilisée dès la découverte d'une nouvelle espèce virale, tant qu'elle induit l'apparition d'un effet cytopathique.

Par conséquent, ces algorithmes de quantification automatique de l'effet cytopathique pourraient se révéler d'une grande utilité pour faire face aux épidémies et pandémies, comme celle du SARS-CoV2 qui touche le monde actuellement, en permettant de tester des milliers de composés par jour et d'identifier rapidement de nouvelles molécules antivirales.

Ainsi, les travaux effectués pendant cette thèse ont permis de développer de nouveaux outils d'intérêts pour la virologie et plus particulièrement pour la recherche antivirale. L'utilisation conjointe de l'HVE-1 ANCHORGFP et de la quantification automatique de l'effet cytopathique sur cellules ED a permis de mettre en lumière l'activité antivirale de deux composés propriétaires sur RK13 et ED. Tout d'abord, le LB56 dont l'activité est intéressante sur les deux lignées cellulaires utilisées mais qui présente une cytotoxicité à faible concentration, puis le LAVR289 dont l'activité antivirale n'a pu être démontrée sur RK13 mais qui présente une fenêtre thérapeutique très intéressante et proche de celle du ganciclovir sur cellules équines.

Il serait désormais intéressant de tester le LB56 ou le LAVR289 en combinaison avec le ganciclovir, et en combinaison ensemble contre HVE-1 afin d'observer si l'action conjointe de deux composés pourrait avoir un effet synergique sur l'infection et la réplication virale. De plus, il serait également intéressant de caractériser ces deux molécules antivirales et d'étudier leur mécanisme d'action afin d'identifier l'étape du cycle viral sur laquelle elles agissent et de définir leur cible. Des études de biodisponibilité, de pharmacocinétique et de cytotoxicité *in vivo* sur petit animal devront par la suite être réalisées afin d'obtenir les informations nécessaires à la mise en œuvre des travaux cliniques sur l'espèce cible. Ces deux composés pourraient ainsi être de bons candidats pour de nouveaux traitements contre la rhinopneumonie équine.

De plus, la quantification automatique de l'effet cytopathique permet d'envisager l'identification de molécules antivirales dirigées également contre les virus à ARN induisant un ECP *in vitro*. Dans cette optique, un protocole de quantification automatique de l'effet cytopathique du calicivirus félin est en cours d'optimisation et pourrait permettre à moyen terme la découverte de nouvelles molécules antivirales utilisables en médecine féline.

Références

1. Lombard M, Pastoret P-P, Moulin AM (2007) A brief history of vaccines and vaccination: -EN- A brief history of vaccines and vaccination -FR- Une brève histoire des vaccins et de la vaccination -ES- Una breve historia de las vacunas y la vacunación. *Rev Sci Tech OIE* 26:29–48. <https://doi.org/10.20506/rst.26.1.1724>
2. van Kammen A (1999) Beijerinck's contribution to the virus concept — an introduction. In: Calisher CH, Horzinek MC (eds) *100 Years of Virology: The Birth and Growth of a Discipline*. Springer Vienna, Vienna, pp 1–8
3. Campillo J, Lazcano A, Becerra A (2015) Viral Genome Size Distribution Does not Correlate with the Antiquity of the Host Lineages. *Frontiers in Ecology and Evolution* 3:. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00143>
4. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H (2013) Viruses: Definition, Structure, Classification. *Molecular Virology* 17–30. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1_2
5. Reddy T, Sansom M (2016) *Computational Virology: from the Inside Out*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858:. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.007>
6. Baltimore D (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 35:235–241
7. Cann AJ (2008) Replication of Viruses. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (eds) *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*. Academic Press, Oxford, pp 406–412
8. Louten J (2016) Chapter 4 - Virus Replication. In: Louten J (ed) *Essential Human Virology*. Academic Press, Boston, pp 49–70
9. Yamauchi Y, Helenius A (2013) Virus entry at a glance. *J Cell Sci* 126:1289. <https://doi.org/10.1242/jcs.119685>
10. Sattentau Q (2008) Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nature Reviews Microbiology* 6:815–826. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1972>
11. Ruggiero E, Richter SN (2020) Chapter Four - Viral G-quadruplexes: New frontiers in virus pathogenesis and antiviral therapy. In: Neidle S (ed) *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Academic Press, pp 101–131
12. Knipe D, Howley P (2013) *Fields virology: Sixth edition*, Lippincott Williams&Wilkins
13. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R (2009) Redefining Chronic Viral Infection. *Cell* 138:30–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>
14. Müller B, Kräusslich H-G (2009) Antiviral Strategies. In: Kräusslich H-G, Bartenschlager R (eds) *Antiviral Strategies*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–24
15. Vardanyan R, Hruby V (2016) Chapter 34 - Antiviral Drugs. In: Vardanyan R, Hruby V (eds) *Synthesis of Best-Seller Drugs*. Academic Press, Boston, pp 687–736

16. Mazzon M, Marsh M (2019) Targeting viral entry as a strategy for broad-spectrum antivirals. *F1000Res* 8:F1000 Faculty Rev-1628. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19694.1>
17. Van Westreenen M, Boucher CAB (2002) Chapter 1 - Classes of Antiviral Drugs. In: Boucher CAB, Galasso GA, Katzenstein DA, Cooper DA (eds) *Practical Guidelines in Antiviral Therapy*. Elsevier, Amsterdam, pp 1–12
18. Coen DM, Richman DD (2013) Antiviral agents. In: *Fields virology: Sixth edition*, Lippincott Williams&Wilkins. p 2664
19. Weller TH, Robbins FC, Enders JF (1949) Cultivation of poliomyelitis virus in cultures of human foreskin and embryonic tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 72:153–155. <https://doi.org/10.3181/00379727-72-17359>
20. Hamre D, Bernstein J, Donovan R (1950) Activity of p-Aminobenzaldehyde, 3-Thiosemicarbazone on Vaccinia Virus in the Chick Embryo and in the Mouse. *Experimental Biology and Medicine* 73:275–278. <https://doi.org/10.3181/00379727-73-17652>
21. Isaacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147:258–267. <https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048>
22. Prusoff WH (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)
23. Herrmann EC (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>
24. Sidwell RW, Huffman JH, Khare, Lois GP, et al (1972) Broad-Spectrum Antiviral Activity of Virazole: 1-f8- D-Ribofuranosyl- 1,2,4-triazole- 3-carboxamide. *Science* 177:705–706. <https://doi.org/10.1126/science.177.4050.705>
25. Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, et al (1977) Selectivity of action of an antitherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:5716–5720. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5716>
26. Schaeffer HJ, Beauchamp L, de Miranda P, et al (1978) 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* 272:583–585. <https://doi.org/10.1038/272583a0>
27. De Clercq E (2009) Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33:307–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.010>
28. 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>
29. DROUET E, GRILLOT R, MORAND S (2021) Pandémies virales de l'ère moderne, *Encyclopédie de l'Environnement*. Encyclopédie de l'Environnement

30. Hosie MJ, Addie D, Belák S, et al (2009) Feline Immunodeficiency: ABCD Guidelines on Prevention and Management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11:575–584. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.006>
31. Rollinson EA (1992) Prospects for Antiviral Chemotherapy in Veterinary Medicine: 1. Feline Virus Diseases. *Antivir Chem Chemother* 3:249–262. <https://doi.org/10.1177/095632029200300501>
32. Rollinson EA (1992) Prospects for Antiviral Chemotherapy in Veterinary Medicine: 2. Avian, Piscine, Canine, Porcine, Bovine and Equine Virus Diseases. *Antivir Chem Chemother* 3:311–326. <https://doi.org/10.1177/095632029200300601>
33. Réda C, Kaufmann E, Delahaye-Duriez A (2020) Machine learning applications in drug development. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18:241–252. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.006>
34. Rollinson EA, White G (1983) Relative activities of acyclovir and BW759 against Aujeszky's disease and equine rhinopneumonitis viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24:221–226. <https://doi.org/10.1128/AAC.24.2.221>
35. Weiss RC, Oostrom-Ram T (1989) Inhibitory effects of ribavirin alone or combined with human alpha interferon on feline infectious peritonitis virus replication in vitro. *Veterinary Microbiology* 20:255–265. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(89\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(89)90049-7)
36. Povey RC (1978) In vitro antiviral efficacy of ribavirin against feline calicivirus, feline viral rhinotracheitis virus, and canine parainfluenza virus. *Am J Vet Res* 39:175–178
37. Weiss RC, Cox NR, Boudreaux MK (1993) Toxicologic effects of ribavirin in cats. *J Vet Pharmacol Ther* 16:301–316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1993.tb00177.x>
38. Ferrari G, Ottinger J, Place C, et al (1993) The Impact of HIV-1 Infection on Phenotypic and Functional Parameters of Cellular Immunity in Chimpanzees. *AIDS Research and Human Retroviruses* 9:647–656. <https://doi.org/10.1089/aid.1993.9.647>
39. Nath BM, Schumann KE, Boyer JD (2000) The chimpanzee and other non-human-primate models in HIV-1 vaccine research. *Trends in Microbiology* 8:426–431. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01816-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01816-3)
40. Pedersen N, Ho E, Brown M, Yamamoto J (1987) Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 235:790–793. <https://doi.org/10.1126/science.3643650>
41. Bendinelli M, Pistello M, Lombardi S, et al (1995) Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin Microbiol Rev* 8:87–112. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.87-112.1995>
42. Miller C, Abdo Z, Ericsson A, et al (2018) Applications of the FIV Model to Study HIV Pathogenesis. *Viruses* 10:206. <https://doi.org/10.3390/v10040206>
43. Hartmann K, Wooding A, Bergmann M (2015) Efficacy of Antiviral Drugs against Feline Immunodeficiency Virus. *Veterinary Sciences* 2:456–476. <https://doi.org/10.3390/vetsci2040456>

44. Voith VL (1985) Attachment of People to Companion Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 15:289–295. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(85\)50301-0](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(85)50301-0)
45. Masure A (2018) Le marché des animaux de compagnie n'a pas besoin de reprendre du poil de la bête
46. Crosia J-L (2011) MARCHÉ MONDIAL DU MÉDICAMENT VÉTÉRINAIRE: ANALYSE DES TENDANCES DES DIX DERNIÈRES ANNÉES ET PERSPECTIVES D'ÉVOLUTION. *Bul de l'Ac Vét de France* 21. <https://doi.org/10.4267/2042/48065>
47. Bassière T (2017) Les antiviraux en médecine vétérinaire : étude bibliographique de l'utilisation des antiviraux chez le chat, le chien et le cheval. Other
48. Hamilton K, Baron MD, Matsuo K, Visser D (2017) Rinderpest eradication: challenges for remaining disease free and implications for future eradication efforts. *Rev Sci Tech OIE* 36:579–588. <https://doi.org/10.20506/rst.36.2.2676>
49. Ek-Kommonen C, Sihvonen L, Pekkanen K, et al (1997) Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Veterinary Record* 141:380–383. <https://doi.org/10.1136/vr.141.15.380>
50. Hurley KF, Pesavento PA, Pedersen NC, et al (2004) An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224:241–249. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.241>
51. Morrow C, Fehler F (2004) Marek's disease : a worldwide problem. In: *Marek's Disease*. Elsevier, pp 49–61
52. Witter RL (1997) Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis* 41:149–163
53. Nair V (2005) Evolution of Marek's disease – A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *The Veterinary Journal* 170:175–183. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.05.009>
54. Backer JA, Vrancken R, Neyts J, Goris N (2013) The potential of antiviral agents to control classical swine fever: A modelling study. *Antiviral Research* 99:245–250. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.013>
55. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ (2001) Risk factors for human disease emergence. *Phil Trans R Soc Lond B* 356:983–989. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>
56. Ryan CP (2008) Zoonoses Likely to Be Used in Bioterrorism. *Public Health Rep* 123:276–281. <https://doi.org/10.1177/003335490812300308>
57. Lofquist JM, Weimert NA, Hayney MS (2003) Smallpox: A review of clinical disease and vaccination. *American Journal of Health-System Pharmacy* 60:749–756. <https://doi.org/10.1093/ajhp/60.8.749>
58. Sklenovská N, Van Ranst M (2018) Emergence of Monkeypox as the Most Important Orthopoxvirus Infection in Humans. *Frontiers in Public Health* 6:241. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00241>

59. Jackson RJ, Ramsay AJ, Christensen CD, et al (2001) Expression of Mouse Interleukin-4 by a Recombinant Ectromelia Virus Suppresses Cytolytic Lymphocyte Responses and Overcomes Genetic Resistance to Mousepox. *J Virol* 75:1205–1210. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1205-1210.2001>
60. Stanford MM, McFadden G (2005) The 'supervirus'? Lessons from IL-4-expressing poxviruses. *Trends in Immunology* 26:339–345. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.04.001>
61. Esteban D, Parker S, Schriever J, et al (2012) Mousepox, A Small Animal Model of Smallpox. In: Isaacs SN (ed) *Vaccinia Virus and Poxvirology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 177–198
62. Maggs DJ (2010) Antiviral Therapy for Feline Herpesvirus Infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 40:1055–1062. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.010>
63. Owens JG, Nasisse MP, Tadepalli SM, Dorman DC (1996) Pharmacokinetics of acyclovir in the cat. *J Vet Pharmacol Ther* 19:488–490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1996.tb00087.x>
64. Garre B, Shebany K, Gryspeerdt A, et al (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>
65. Payne S (2017) Chapter 4 - Methods to Study Viruses. In: Payne S (ed) *Viruses*. Academic Press, pp 37–52
66. Ryu W-S (2017) Diagnosis and Methods. In: *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Elsevier, pp 47–62
67. Dulbecco R, Vogt M (1954) PLAQUE FORMATION AND ISOLATION OF PURE LINES WITH POLIOMYELITIS VIRUSES. *Journal of Experimental Medicine* 99:167–182. <https://doi.org/10.1084/jem.99.2.167>
68. Salinas FM, Nebreda AD, Vázquez L, et al (2020) Imiquimod suppresses respiratory syncytial virus (RSV) replication via PKA pathway and reduces RSV induced-inflammation and viral load in mice lungs. *Antiviral Res* 179:104817–104817. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104817>
69. Wachsman MB, López EM, Ramirez JA, et al (2000) Antiviral Effect of Brassinosteroids against Herpes Virus and Arenaviruses. *Antivir Chem Chemother* 11:71–77. <https://doi.org/10.1177/095632020001100107>
70. Visintini Jaime MF, Redko F, Muschietti LV, et al (2013) In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. *Virology Journal* 10:245. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-245>
71. Boltz D, Peng X, Muzzio M, et al (2018) Activity of enisamium, an isonicotinic acid derivative, against influenza viruses in differentiated normal human bronchial epithelial cells. *Antivir Chem Chemother* 26:2040206618811416. <https://doi.org/10.1177/2040206618811416>

72. Cong Y, Hart BJ, Gross R, et al (2018) MERS-CoV pathogenesis and antiviral efficacy of licensed drugs in human monocyte-derived antigen-presenting cells. *PLOS ONE* 13:e0194868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194868>
73. Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, et al (2009) Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol* 40:1–11. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>
74. Mathys V, Lefèvre P, Fontaine V, et al (2007) La PCR en temps réel: principe et application en infectiologie. *Antibiotiques* 9:205–211. [https://doi.org/10.1016/S1294-5501\(07\)91380-1](https://doi.org/10.1016/S1294-5501(07)91380-1)
75. Clementi M, Menzo S, Manzin A, Bagnarelli P (1995) Quantitative molecular methods in virology. *Archives of Virology* 140:1523–1539. <https://doi.org/10.1007/BF01322527>
76. Mackay IM (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30:1292–1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
77. Stránská R, van Loon AM, Polman M, Schuurman R (2002) Application of Real-Time PCR for Determination of Antiviral Drug Susceptibility of Herpes Simplex Virus. *AAC* 46:2943–2947. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2943-2947.2002>
78. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, et al (2020) An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med* 12:eabb5883. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb5883>
79. Son K-N, Liang Z, Lipton HL (2015) Double-Stranded RNA Is Detected by Immunofluorescence Analysis in RNA and DNA Virus Infections, Including Those by Negative-Stranded RNA Viruses. *J Virol* 89:9383–9392. <https://doi.org/10.1128/JVI.01299-15>
80. MacLachlan NJ, Dubovi EJ (2017) Chapter 5 - Laboratory Diagnosis of Viral Infections. In: *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Academic Press, Boston, pp 105–129
81. Fang J, Li H, Kong D, et al (2016) Structure-based discovery of two antiviral inhibitors targeting the NS3 helicase of Japanese encephalitis virus. *Scientific Reports* 6:34550. <https://doi.org/10.1038/srep34550>
82. Solly K, Wang X, Xu X, et al (2004) Application of Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) Technology to Cell-Based Assays. *ASSAY and Drug Development Technologies* 2:363–372. <https://doi.org/10.1089/adt.2004.2.363>
83. Limame R, Wouters A, Pauwels B, et al (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>
84. Hamidi H, Lilja J, Ivaska J (2017) Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion. *BIO-PROTOCOL* 7:. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2646>
85. Kustermann S, Boess F, Bunes A, et al (2013) A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicology in Vitro* 27:1589–1595. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.019>

86. Golke A, Cymerys J, Słońska A, et al (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* 15:151–153. <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0126-4>
87. 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>
88. Witkowski PT, Schuenadel L, Wiethaus J, et al (2010) Cellular impedance measurement as a new tool for poxvirus titration, antibody neutralization testing and evaluation of antiviral substances. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401:37–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.003>
89. Mercorelli B, Palù G, Loregian A (2018) Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We? *Trends in Microbiology* 26:865–876. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.004>
90. Fraietta I, Gaspari F (2016) The development of high-content screening (HCS) technology and its importance to drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 11:501–514. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1165203>
91. Ellinger B, Bojkova D, Zaliani A, et al (2021) A SARS-CoV-2 cytopathicity dataset generated by high-content screening of a large drug repurposing collection. *Scientific Data* 8:70. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00848-4>
92. Cruz DJM, Koishi AC, Taniguchi JB, et al (2013) High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7:e2073. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002073>
93. Bernatchez JA, Yang Z, Coste M, et al (2018) Development and Validation of a Phenotypic High-Content Imaging Assay for Assessing the Antiviral Activity of Small-Molecule Inhibitors Targeting Zika Virus. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e00725-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00725-18>
94. Zhou T, Tan L, Cederquist GY, et al (2017) High-Content Screening in hPSC-Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. *Cell Stem Cell* 21:274-283.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.06.017>
95. Thieulent CJ, Hue ES, Fortier CI, et al (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>
96. Thieulent C, Hue ES, Sutton G, et al (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* 183:104931. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104931>
97. Robinett CC, Straight A, Li G, et al (1996) In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *Journal of Cell Biology* 135:1685–1700. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1685>

98. Lindhout BI, Fransz P, Tessadori F, et al (2007) Live cell imaging of repetitive DNA sequences via GFP-tagged polydactyl zinc finger proteins. *Nucleic Acids Research* 35:e107–e107. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm618>
99. Ma H, Reyes-Gutierrez P, Pederson T (2013) Visualization of repetitive DNA sequences in human chromosomes with transcription activator-like effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:21048–21053. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319097110>
100. Ma H, Tu L-C, Naseri A, et al (2016) Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nat Biotechnol* 34:528–530. <https://doi.org/10.1038/nbt.3526>
101. Chen B, Guan J, Huang B (2016) Imaging Specific Genomic DNA in Living Cells. *Annu Rev Biophys* 45:1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010830>
102. Zhang F, Wen Y, Guo X (2014) CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics* 23:R40–R46. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>
103. Lim HC, Surovtsev IV, Beltran BG, et al (2014) Evidence for a DNA-relay mechanism in ParABS-mediated chromosome segregation. *eLife* 3:e02758. <https://doi.org/10.7554/eLife.02758>
104. Jalal ASB, Le TBK (2020) Bacterial chromosome segregation by the ParABS system. *Open Biol* 10:200097. <https://doi.org/10.1098/rsob.200097>
105. Gerdes K, Howard M, Szardenings F (2010) Pushing and Pulling in Prokaryotic DNA Segregation. *Cell* 141:927–942. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.033>
106. Saad H, Gallardo F, Dalvai M, et al (2014) DNA Dynamics during Early Double-Strand Break Processing Revealed by Non-Intrusive Imaging of Living Cells. *PLoS Genet* 10:e1004187. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004187>
107. Germier T, Kocanova S, Walther N, et al (2017) Real-Time Imaging of a Single Gene Reveals Transcription-Initiated Local Confinement. *Biophysical Journal* 113:1383–1394. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.014>
108. Komatsu T, Quentin-Froignant C, Carlon-Andres I, et al (2018) *In Vivo* Labelling of Adenovirus DNA Identifies Chromatin Anchoring and Biphasic Genome Replication. *J Virol* 92:e00795-18, [/jvi/92/18/e00795-18.atom](https://doi.org/10.1128/JVI.00795-18). <https://doi.org/10.1128/JVI.00795-18>
109. Müller TG, Zila V, Peters K, et al (2020) HIV-1 uncoating by release of viral cDNA from capsid-like structures in the nucleus of infected cells. *Microbiology*
110. Blanco-Rodriguez G, Gazi A, Monel B, et al (2020) Remodeling of the Core Leads HIV-1 Preintegration Complex into the Nucleus of Human Lymphocytes. *J Virol* 94:e00135-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00135-20>
111. Gallardo F, Schmitt D, Brandely R, et al (2020) Fluorescent Tagged Vaccinia Virus Genome Allows Rapid and Efficient Measurement of Oncolytic Potential and Discovery of Oncolytic Modulators. *Biomedicines* 8:543. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120543>

112. Quillien L, Top S, Kappler-Gratias S, et al (2021) A Novel Imaging Approach for Single-Cell Real-Time Analysis of Oncolytic Virus Replication and Efficacy in Cancer Cells. *Human Gene Therapy* 32:166–177. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.294>
113. Hinsberger A, Graillot B, Blachère Lopez C, et al (2020) Tracing Baculovirus AcMNPV Infection Using a Real-Time Method Based on ANCHORTM DNA Labeling Technology. *Viruses* 12:50. <https://doi.org/10.3390/v12010050>
114. Thiry J, Keuser V, Muylkens B, et al (2006) Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res* 37:169–190. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005052>
115. Noguchi K, Shimoda H, Terada Y, et al (2013) Isolation of a novel herpesvirus from a Pacific white-sided dolphin. *Arch Virol* 158:695–699. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1536-z>
116. Dimock WW, Edwards PR (1932) *Infections of Fetuses and Foals*. Lexington : Kentucky Agricultural Experiment Station
117. Manninger R (1949) Studies on infectious abortion in mares due to a filterable virus. *Acta Vet Acad Sci Hungaricae* 1:62–69
118. DOLL E, RICHARDS M, WALLACE M (1954) Cultivation of the equine influenza virus in suckling Syrian hamsters. Its similarity to the equine abortion virus. *The Cornell veterinarian* 44:133–138
119. Doll ER, Wallace E, Richards MG (1954) Thermal, hematological, and serological responses of weanling horses following inoculation with equine abortion virus: its similarity to equine influenza. *Cornell Vet* 44:181–190
120. Doll E, Kintner JH (1954) A comparative study of the equine abortion and equine influenza viruses. *The Cornell veterinarian* 44 3:355–67
121. Bryans JT, Crowe ME, Doll ER, Mccollum WH (1957) Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares; its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet* 47:3–41
122. PLUMMER G, WATERSON AP (1963) Equine herpes viruses. *Virology* 19:412–416. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(63\)90083-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(63)90083-7)
123. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, et al (2009) The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154:171–177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>
124. Pellett P, Roizman B (2013) Chapter 59: Herpesviridae. In: *Field's virology*, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, pp 1802–1822
125. Payne S (2017) Family Herpesviridae. In: *Viruses*. Elsevier, pp 269–278
126. Payne S (2017) Chapter 34 - Family Herpesviridae. In: Payne S (ed) *Viruses*. Academic Press, pp 269–278
127. Telford EAR, Watson MS, McBride K, Davison AJ (1992) The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189:304–316. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90706-U](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90706-U)

128. Ben-Porat T, Veach RA, Ihara S (1983) Localization of the regions of homology between the genomes of herpes simplex virus, type 1, and pseudorabies virus. *Virology* 127:194–204. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90383-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90383-5)
129. Newcomb WW, Trus BL, Booy FP, et al (1993) Structure of the Herpes Simplex Virus Capsid Molecular Composition of the Pentons and the Triplexes. *Journal of Molecular Biology* 232:499–511. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1406>
130. Brown JC, Newcomb WW (2011) Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Current Opinion in Virology* 1:142–149. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.003>
131. Allen G, Kydd J, Slater J, Smith K (2004) Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections. In: *Infectious Diseases of Livestock*. Oxford, UK: Oxford University Press, pp 829–859
132. Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ (2009) Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Research* 145:173–186. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.007>
133. Owen D, Crump C, Graham S (2015) Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses* 7:5084–5114. <https://doi.org/10.3390/v7092861>
134. Paillot R, Case R, Ross J, et al (2008) Equine Herpes Virus 1: Virus, Immunity and Vaccines. *The Open Veterinary Science Journal* 2:68–91. <https://doi.org/10.2174/1874318800802010068>
135. 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)
136. Oh M-J, Akhtar J, Desai P, Shukla D (2010) A role for heparan sulfate in viral surfing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391:176–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.027>
137. Spear PG (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 6:401–410. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00389.x>
138. Frampton AR, Goins WF, Cohen JB, et al (2005) Equine Herpesvirus 1 Utilizes a Novel Herpesvirus Entry Receptor. *Journal of Virology* 79:3169–3173. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.3169-3173.2005>
139. Kurtz BM, Singletary LB, Kelly SD, Frampton AR (2010) *Equus caballus* Major Histocompatibility Complex Class I Is an Entry Receptor for Equine Herpesvirus Type 1. *Journal of Virology* 84:9027–9034. <https://doi.org/10.1128/JVI.00287-10>
140. Van de Walle GR, Peters ST, VanderVen BC, et al (2008) Equine Herpesvirus 1 Entry via Endocytosis Is Facilitated by V Integrins and an RSD Motif in Glycoprotein D. *Journal of Virology* 82:11859–11868. <https://doi.org/10.1128/JVI.00868-08>
141. Kasem S, Safaa A, Warda, Khodeir M (2012) Susceptibility of different cell cultures to equine herpesvirus-1. 2012

142. Trapp S, von Einem J, Hofmann H, et al (2005) Potential of Equine Herpesvirus 1 as a Vector for Immunization. *Journal of Virology* 79:5445–5454. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5445-5454.2005>
143. Wohlsein P, Lehmecker A, Spitzbarth I, et al (2011) Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts. *Veterinary Microbiology* 149:456–460. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.024>
144. Kanitz FA, Cargnelutti JF, Anziliero D, et al (2015) Respiratory and neurological disease in rabbits experimentally infected with equid herpesvirus 1. *Microbial Pathogenesis* 87:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.07.007>
145. Mesquita L, Arévalo A, Zanatto D, et al (2017) Equine herpesvirus type 1 induces both neurological and respiratory disease in Syrian hamsters. *Veterinary Microbiology* 203:. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.007>
146. Ibrahim ESM, Kinoh M, Matsumura T, et al (2007) Genetic relatedness and pathogenicity of equine herpesvirus 1 isolated from onager, zebra and gazelle. *Arch Virol* 152:245–255. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0855-3>
147. Favoreel HW, Enquist LW, Feierbach B (2007) Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. *Trends in Microbiology* 15:426–433. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.08.003>
148. Azab W, Gramatica A, Herrmann A, Osterrieder N (2015) Binding of Alphaherpesvirus Glycoprotein H to Surface $\alpha 4\beta 1$ -Integrins Activates Calcium-Signaling Pathways and Induces Phosphatidylserine Exposure on the Plasma Membrane. *mBio* 6:e01552-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01552-15>
149. Azab W, Osterrieder K (2017) Initial Contact: The First Steps in Herpesvirus Entry. In: Osterrieder K (ed) *Cell Biology of Herpes Viruses*. Springer International Publishing, Cham, pp 1–27
150. Sasaki M, Hasebe R, Makino Y, et al (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>
151. Frampton AR, Stolz DB, Uchida H, et al (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>
152. Sodeik B, Ebersold MW, 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>
153. Mabit H, Nakano MY, Prank U, et al (2002) Intact Microtubules Support Adenovirus and Herpes Simplex Virus Infections. *JVI* 76:9962–9971. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.19.9962-9971.2002>
154. Döhner K, Wolfstein A, Prank U, et al (2002) Function of Dynein and Dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid Transport. *MBoC* 13:2795–2809. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0348>

155. Radtke K, Dohner K, Sodeik B (2006) Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* 8:387–400. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00679.x>
156. Frampton AR, Uchida H, von Einem J, et al (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>
157. Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, et al (2000) Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells: Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro. *Mol Cell Biol* 20:4922–4931. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.13.4922-4931.2000>
158. Cohen S, Au S, Panté N (2011) How viruses access the nucleus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813:1634–1645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.009>
159. Caughman GB, Staczek J, O'Callaghan DJ (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)
160. Gray WL, Baumann RP, Robertson AT, et al (1987) 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)
161. Batterson W, Roizman B (1983) Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *Journal of virology* 46 2:371–7
162. Campbell MEM, Palfreyman JW, Preston CM (1984) Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *Journal of Molecular Biology* 180:1–19. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90427-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90427-3)
163. Purewal AS, Allsopp R, Riggio M, et al (1994) Equid Herpesviruses 1 and 4 Encode Functional Homologs of the Herpes Simplex Virus Type 1 Virion Transactivator Protein, VP16. *Virology* 198:385–389. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1047>
164. Thomsen DR, Newcomb WW, Brown JC, Homa FL (1995) Assembly of the herpes simplex virus capsid: requirement for the carboxyl-terminal twenty-five amino acids of the proteins encoded by the UL26 and UL26.5 genes. *J Virol* 69:3690–3703. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.6.3690-3703.1995>
165. Hong Z, Beaudet-Miller M, Durkin J, et al (1996) Identification of a minimal hydrophobic domain in the herpes simplex virus type 1 scaffolding protein which is required for interaction with the major capsid protein. *J Virol* 70:533
166. Huffman JB, Newcomb WW, Brown JC, Homa FL (2008) Amino Acids 143 to 150 of the Herpes Simplex Virus Type 1 Scaffold Protein Are Required for the Formation of Portal-Containing Capsids. *JVI* 82:6778–6781. <https://doi.org/10.1128/JVI.00473-08>
167. Newcomb WW, Homa FL, Thomsen DR, et al (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>

168. Sheaffer AK, Newcomb WW, Gao M, et al (2001) Herpes Simplex Virus DNA Cleavage and Packaging Proteins Associate with the Procapsid prior to Its Maturation. *J Virol* 75:687–698. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.2.687-698.2001>
169. van Genderen IL, Brandimarti R, Torrisi MR, et al (1994) The Phospholipid Composition of Extracellular Herpes Simplex Virions Differs from That of Host Cell Nuclei. *Virology* 200:831–836. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1252>
170. Sugimoto K, Uema M, Sagara H, et al (2008) Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *J Virol* 82:5198–5211. <https://doi.org/10.1128/JVI.02681-07>
171. Johnson DC, Baines JD (2011) Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol* 9:382–394. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2559>
172. Reynolds AE, Liang L, Baines JD (2004) Conformational Changes in the Nuclear Lamina Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 Require Genes UL31 and UL34. *JVI* 78:5564–5575. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5564-5575.2004>
173. Purves FC, Spector D, Roizman B (1991) The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *Journal of Virology* 65:5757–5764. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.11.5757-5764.1991>
174. Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, et al (2002) Ultrastructural Localization of the Herpes Simplex Virus Type 1 UL31, UL34, and US3 Proteins Suggests Specific Roles in Primary Envelopment and Egress of Nucleocapsids. *JVI* 76:8939–8952. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.17.8939-8952.2002>
175. Wisner TW, Wright CC, Kato A, et al (2009) Herpesvirus gB-Induced Fusion between the Virion Envelope and Outer Nuclear Membrane during Virus Egress Is Regulated by the Viral US3 Kinase. *JVI* 83:3115–3126. <https://doi.org/10.1128/JVI.01462-08>
176. Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, et al (2007) Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10187–10192. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703790104>
177. Hutchinson L, Johnson DC (1995) Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. *J Virol* 69:5401–5413. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.9.5401-5413.1995>
178. Farnsworth A, Wisner TW, Johnson DC (2007) Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD. *J Virol* 81:319–331. <https://doi.org/10.1128/JVI.01842-06>
179. Lau S-YK, Crump CM (2015) HSV-1 gM and the gK/pUL20 complex are important for the localization of gD and gH/L to viral assembly sites. *Viruses* 7:915–938. <https://doi.org/10.3390/v7030915>
180. Ren Y, Bell S, Zenner HL, et al (2012) Glycoprotein M is important for the efficient incorporation of glycoprotein H-L into herpes simplex virus type 1 particles. *J Gen Virol* 93:319–329. <https://doi.org/10.1099/vir.0.035444-0>

181. Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, et al (2001) Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. *Journal of Virology* 75:3675–3684. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3675-3684.2001>
182. Proff A, Spiesschaert B, Izume S, et al (2016) The Role of the Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) US3-Encoded Protein Kinase in Actin Reorganization and Nuclear Egress. *Viruses* 8:275. <https://doi.org/10.3390/v8100275>
183. Guggemoos S, Just FT, Neubauer A (2006) The Equine Herpesvirus 1 UL20 Product Interacts with Glycoprotein K and Promotes Egress of Mature Particles. *J Virol* 80:95. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.1.95-107.2006>
184. Rudolph J, O'Callaghan DJ, Osterrieder N (2002) Cloning of the Genomes of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Strains KyA and RaCL11 as Bacterial Artificial Chromosomes (BAC). *J Vet Med Series B* 49:31–36. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00534.x>
185. GRAY A, TOKUMARU T, SCOTT TFM (1958) Different cytopathogenic effects observed in HeLa cells infected with herpes simplex virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 8:59–76. <https://doi.org/10.1007/BF01242313>
186. Wellington JE, Love DN, Whalley JM (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>
187. 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>
188. Kamel M, Pavulraj S, Osterrieder K, Azab W (2019) EHV-1 Pathogenesis: Current in vitro Models and Future Perspectives. *Frontiers in Veterinary Science* 6:. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00251>
189. Laval K, Poelaert KCK, Van Cleemput J, et al (2021) The Pathogenesis and Immune Evasive Mechanisms of Equine Herpesvirus Type 1. *Front Microbiol* 12:662686–662686. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662686>
190. Oladunni FS, Horohov DW, Chambers TM (2019) EHV-1: A Constant Threat to the Horse Industry. *Front Microbiol* 10:2668. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02668>
191. Reed S, Toribio R (2005) Equine herpesvirus 1 and 4. *The Veterinary clinics of North America Equine practice* 20:631–42. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2004.09.001>
192. Allen GP, Bryans JT (1986) Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog Vet Microbiol Immunol* 2:78–144
193. Kydd JH, Smith KC, Hannant D, et al (1994) Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. *Equine Vet J* 26:466–469. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04051.x>
194. Gibson JS, Slater JD, Awan AR, Field HJ (1992) Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch Virol* 123:351–366. <https://doi.org/10.1007/BF01317269>
195. Allen G (2002) Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4. In: *Equine Respiratory Diseases*. International Veterinary Information Service

196. Paillot R, Case R, Ross J, et al Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. 24
197. Zhao J, Poelaert KCK, Van Cleemput J, Nauwynck HJ (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). *Vet Res* 48:14. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0419-4>
198. Baghi HB, Nauwynck HJ (2014) Impact of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection on the migration of monocytic cells through equine nasal mucosa. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 37:321–329. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.09.004>
199. Vandekerckhove AP, Glorieux S, Gryspeerdt AC, et al (2010) Replication kinetics of neurovirulent versus non-neurovirulent equine herpesvirus type 1 strains in equine nasal mucosal explants. *J Gen Virol* 91:2019–2028. <https://doi.org/10.1099/vir.0.019257-0>
200. Wilsterman S, Soboll-Hussey G, Lunn DP, et al (2011) Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Veterinary Microbiology* 149:40–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.004>
201. Gryspeerdt AC, Vandekerckhove AP, Garré B, et al (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>
202. Laval K, Favoreel HW, Poelaert KCK, et al (2015) Equine Herpesvirus Type 1 Enhances Viral Replication in CD172a⁺ Monocytic Cells upon Adhesion to Endothelial Cells. *J Virol* 89:10912. <https://doi.org/10.1128/JVI.01589-15>
203. Spiesschaert B, Goldenbogen B, Taferner S, et al (2015) Role of gB and pUS3 in Equine Herpesvirus 1 Transfer between Peripheral Blood Mononuclear Cells and Endothelial Cells: a Dynamic *In Vitro* Model. *J Virol* 89:11899–11908. <https://doi.org/10.1128/JVI.01809-15>
204. Walter J, Seeh C, Fey K, et al (2013) Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55:19. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-19>
205. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, et al (1993) An immunohistological study of the uterus of mares following experimental infection by equid herpesvirus 1. *Equine Vet J* 25:36–40. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb02898.x>
206. Borchers K, Thein R, Sterner-Kock A (2006) Pathogenesis of equine herpesvirus-associated neurological disease: A revised explanation. *Equine veterinary journal* 38:283–7. <https://doi.org/10.2746/042516406776866462>
207. Wilson WD (1997) Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 13:53–72. [https://doi.org/10.1016/s0749-0739\(17\)30255-9](https://doi.org/10.1016/s0749-0739(17)30255-9)
208. Lunn DP, Davis-Poynter N, Flaminio MJBF, et al (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>

209. Pronost S, Legrand L, Pitel P-H, et al (2012) Outbreak of equine herpesvirus myeloencephalopathy in France: a clinical and molecular investigation. *Transbound Emerg Dis* 59:256–263. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01263.x>
210. Allen G, Bolin D, Bryant U, et al (2008) Prevalence of latent, neuropathogenic equine herpesvirus-1 in the Thoroughbred broodmare population of central Kentucky. *Equine veterinary journal* 40:105–10. <https://doi.org/10.2746/042516408X253127>
211. Allen G, Bolin D, Bryant U, et al (2008) Prevalence of latent, neuropathogenic equine herpesvirus-1 in the Thoroughbred broodmare population of central Kentucky. *Equine veterinary journal* 40:105–10. <https://doi.org/10.2746/042516408X253127>
212. C Bergeron C, Allano M, Cluzel C, et al (2020) Equine herpesvirus 1-associated ulcerative dermatitis in a horse. *Vet Dermatol* 31:407–409. <https://doi.org/10.1111/vde.12869>
213. Soboll Hussey G, Goehring L, Lunn D, et al (2013) Experimental infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces chorioretinal lesions. *Veterinary research* 44:118. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-118>
214. Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, et al (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>
215. Goodman LB, Loregian A, Perkins GA, et al (2007) A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog* 3:e160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030160>
216. Van de Walle GR, Goupil R, Wishon C, et al (2009) A single-nucleotide polymorphism in a herpesvirus DNA polymerase is sufficient to cause lethal neurological disease. *J Infect Dis* 200:20–25. <https://doi.org/10.1086/599316>
217. Garvey M, Lyons R, Hector R, et al (2019) Molecular Characterisation of Equine Herpesvirus 1 Isolates from Cases of Abortion, Respiratory and Neurological Disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens* 8:7. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010007>
218. Hussey GS, Hussey SB, Wagner B, et al (2011) Evaluation of immune responses following infection of ponies with an EHV-1 ORF1/2 deletion mutant. *Veterinary Research* 42:23. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-23>
219. Schnabel CL, Wimer CL, Perkins G, et al (2018) Deletion of the ORF2 gene of the neuropathogenic equine herpesvirus type 1 strain Ab4 reduces virulence while maintaining strong immunogenicity. *BMC Vet Res* 14:245. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1563-4>
220. Wimer CL, Schnabel CL, Perkins G, et al (2018) The deletion of the ORF1 and ORF71 genes reduces virulence of the neuropathogenic EHV-1 strain Ab4 without compromising host immunity in horses. *PLOS ONE* 13:e0206679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206679>
221. Shakya AK, O'Callaghan DJ, Kim SK (2017) Comparative Genomic Sequencing and Pathogenic Properties of Equine Herpesvirus 1 KyA and RaCL11. *Front Vet Sci* 4:211. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00211>

222. Croen KD, Ostrove JM, Dragovic LJ, et al (1987) Latent herpes simplex virus in human trigeminal ganglia. Detection of an immediate early gene "anti-sense" transcript by in situ hybridization. *N Engl J Med* 317:1427–1432. <https://doi.org/10.1056/NEJM198712033172302>
223. Kennedy PG, Grinfeld E, Gow JW (1998) Latent varicella-zoster virus is located predominantly in neurons in human trigeminal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4658–4662. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4658>
224. Ackermann M, Peterhans E, Wyler R (1982) DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am J Vet Res* 43:36–40
225. Hafezi W, Lorentzen EU, Eing BR, et al (2012) Entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) into the distal axons of trigeminal neurons favors the onset of nonproductive, silent infection. *PLoS Pathog* 8:e1002679–e1002679. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002679>
226. Kim JY, Mandarino A, Chao MV, et al (2012) Transient reversal of episome silencing precedes VP16-dependent transcription during reactivation of latent HSV-1 in neurons. *PLoS Pathog* 8:e1002540–e1002540. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002540>
227. Deshmane SL, Fraser NW (1989) During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J Virol* 63:943
228. Kwiatkowski DL, Thompson HW, Bloom DC (2009) The polycomb group protein Bmi1 binds to the herpes simplex virus 1 latent genome and maintains repressive histone marks during latency. *J Virol* 83:8173–8181. <https://doi.org/10.1128/JVI.00686-09>
229. Wang Q-Y, Zhou C, Johnson KE, et al (2005) Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16055–16059. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505850102>
230. Slater JD, Borchers K, Thackray AM, Field HJ (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>
231. Chesters PM, Allsop R, Purewal A, Edington N (1997) Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J Virol* 71:3437–3443. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.5.3437-3443.1997>
232. Roizman B, Zhou G, Du T (2011) Checkpoints in productive and latent infections with herpes simplex virus 1: conceptualization of the issues. *Journal of NeuroVirology* 17:512–517. <https://doi.org/10.1007/s13365-011-0058-x>
233. Perng G-C, Jones C, Ciacci-Zanella J, et al (2000) Virus-Induced Neuronal Apoptosis Blocked by the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript. *Science* 287:1500. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1500>
234. Thompson RL, Sawtell NM (2001) Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival. *J Virol* 75:6660–6675. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6660-6675.2001>

235. Edington N, Bridges CG, Huckle A (1985) Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. *Equine Vet J* 17:369–372. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1985.tb02524.x>
236. Thompson RL, Preston CM, Sawtell NM (2009) De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from HSV latency in vivo. *PLoS Pathog* 5:e1000352–e1000352. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000352>
237. Wilson AC, Mohr I (2012) A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Trends Microbiol* 20:604–611. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.08.005>
238. Cliffe AR, Arbuckle JH, Vogel JL, et al (2015) Neuronal Stress Pathway Mediating a Histone Methyl/Phospho Switch Is Required for Herpes Simplex Virus Reactivation. *Cell Host Microbe* 18:649–658. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.11.007>
239. Swigut T, Wysocka J (2007) H3K27 Demethylases, at Long Last. *Cell* 131:29–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.026>
240. Messer HGP, Jacobs D, Dhummakupt A, Bloom DC (2015) Inhibition of H3K27me3-specific histone demethylases JMJD3 and UTX blocks reactivation of herpes simplex virus 1 in trigeminal ganglion neurons. *J Virol* 89:3417–3420. <https://doi.org/10.1128/JVI.03052-14>
241. Gauthier A (2014) Importance des myéloencéphalites herpétiques équinés en France : étude rétrospective des cas déclarés au RESPE entre 2011 et 2013 et étude d'un foyer dans le Finistère (2012). Claude Bernard-Lyon 1
242. Jourdain M, Geyl C (2019) ÉPIDÉMIE DE RHINOPNEUMONIE 2018 : QUELS IMPACTS SANITAIRES ET FINANCIERS ? In: Institut français du cheval et de l'équitation. https://www.ifce.fr/wp-content/uploads/2019/05/IFCE_OESC_Note-Rhinopneumonie.pdf
243. Jourdan M, Marcillaud-Pitel C (2018) Rhinopneumonie : retour sur l'épizootie. Bilan de la crise 2018. In: AVEF - Conférence Annuelle - Bordeaux, 2018 by Association des Vétérinaires Équins Français. <https://www.avis.org/library/avef/avef-conf%C3%A9rence-annuelle-bordeaux-2018/rhinopneumonie-retour-sur-l%C3%A9pizootie-bilan-de>
244. Allen G (2010) Epidemic disease caused by Equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *Equine Veterinary Education* 14:136–142. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2002.tb00157.x>
245. Goehring LS, Landolt GA, Morley PS (2010) Detection and management of an outbreak of equine herpesvirus type 1 infection and associated neurological disease in a veterinary teaching hospital. *J Vet Intern Med* 24:1176–1183. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0558.x>
246. van Maanen C (2002) Equine herpesvirus 1 and 4 infections: An update. *Veterinary Quarterly* 24:57–78. <https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695126>
247. Heldens JGM, Hannant D, Cullinane AA, et al (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)

248. Packiarajah P, Walker C, Gilkerson J, et al (1998) Immune responses and protective efficacy of recombinant baculovirus-expressed glycoproteins of equine herpesvirus 1 (EHV-1) gB, gC and gD alone or in combinations in BALB/c mice. *Veterinary Microbiology* 61:261–278. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00189-8)
249. Hannant D, Jessett DM, O'Neill T, et al (1993) Responses of ponies to equid herpesvirus-1 ISCOM vaccination and challenge with virus of the homologous strain. *Res Vet Sci* 54:299–305. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90126-z](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90126-z)
250. Foote CE, Raidal SL, Pecenpetelovska G, et al (2006) Inoculation of mares and very young foals with EHV-1 glycoproteins D and B reduces virus shedding following respiratory challenge with EHV-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 111:97–108. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.012>
251. Walker C, Love DN, Whalley JM (1999) Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. *Veterinary Microbiology* 68:3–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00056-5)
252. Foote CE, Love DN, Gilkerson JR, et al (2005) Serum antibody responses to equine herpesvirus 1 glycoprotein D in horses, pregnant mares and young foals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 105:47–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.12.012>
253. Mohd Lila M, Rixon F, McLauchlan J, Field H (2002) Protection of specific-pathogen-free (SPF) foals from severe equine herpesvirus type-1 (EHV-1) infection following immunization with non-infectious L-particles. *Journal of Microbiology* 40:183–192
254. Patel JR, Bateman H, Williams J, Didlick S (2003) Derivation and characterisation of a live equid herpes virus-1 (EHV-1) vaccine to protect against abortion and respiratory disease due to EHV-1. *Veterinary Microbiology* 91:23–39. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00259-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00259-6)
255. Appel MJG (1978) Reversion to Virulence of Attenuated Canine Distemper Virus In Vivo and In Vitro. *Journal of General Virology*, 41:385–393
256. Friday PA, Scarratt WK, Elvinger F, et al (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. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02236.x>
257. Henninger RW, Reed SM, Saville WJ, et al (2007) Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *J Vet Intern Med* 21:157–165. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[157:oonddb\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[157:oonddb]2.0.co;2)
258. Delerue M, Marcillaud-Pitel C (2020) Vaccination : principes et bonnes pratiques. In: Institut français du cheval et de l'équitation. <https://equipedia.ifce.fr/sante-et-bien-etre-animal/soin-prevention-et-medication/prevention/vaccination-principes-et-bonnes-pratiques>
259. Andrei G, Snoeck R (2013) Advances in the treatment of varicella-zoster virus infections. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)* 67:107–168. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-405880-4.00004-4>
260. Piret J, Boivin G (2016) Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Curr Opin Infect Dis* 29:654–662. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000288>

261. Drew WL, Erlich KS (2012) Chapter 34 - Management of herpesvirus infections (cytomegalovirus, herpes simplex virus, and varicella-zoster virus). In: Volberding PA, Greene WC, Lange JMA, et al (eds) *Sande's HIV/AIDS Medicine*. W.B. Saunders, London, pp 433–454
262. Mui UN, Haley CT, Tying SK (2021) 11 - Systemic Antiviral Agents. In: Wolverton SE (ed) *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy (Fourth Edition)*. Elsevier, pp 114-125.e3
263. Maxwell LK (2017) Antiherpetic Drugs in Equine Medicine. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 33:99–125. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.12.002>
264. Garre B, Vandermeulen K, Nugent J, et al (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>
265. Oliveira AL de, Cargnelutti JF, Mortari APG, et al (2018) In vitro activity of six antiviral drugs against equid alphaherpesvirus type 1 indicates ganciclovir as promising drug for in vivo studies. *Cienc Rural* 48:. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180085>
266. Bentz BG, Maxwell LK, Erkert RS, et al (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>
267. Wong DM, Maxwell LK, Wilkins PA (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>
268. Maxwell LK, Bentz BG, Bourne DWA, Erkert RS (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>
269. Maxwell LK, Bentz BG, Gilliam LL, et al (2017) Efficacy of the early administration of valacyclovir hydrochloride for the treatment of neuropathogenic equine herpesvirus type-1 infection in horses. *Am J Vet Res* 78:1126–1139. <https://doi.org/10.2460/ajvr.78.10.1126>
270. Garré B, Gryspeerdt A, Croubels S, et al (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>
271. Aoki FY (2015) 45 - Antivirals against Herpes Viruses. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds) *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp 546-562.e7
272. Smith K, Galloway K, Hodges S, et al (1983) Sensitivity of equine herpesviruses 1 and 3 in vitro to a new nucleoside analogue, 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxy] methyl] guanine. *American journal of veterinary research* 44:1032–1035
273. Carmichael RJ, Whitfield C, Maxwell LK (2013) Pharmacokinetics of ganciclovir and valganciclovir in the adult horse. *J Vet Pharmacol Ther* 36:441–449. <https://doi.org/10.1111/jvp.12029>
274. Thieulent C (2020) Criblage in vitro de molécules antivirales contre l'herpèsvirus équin-1 par impédancemétrie et évaluation clinique de l'effet du valganciclovir

275. de la Fuente R, Awan AR, Field HJ (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)
276. Tsujimura K, Yamada M, Nagata S, et al (2010) Pharmacokinetics of penciclovir after oral administration of its prodrug famciclovir to horses. *J Vet Med Sci* 72:357–361. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0350>
277. Iwayama S, Ono N, Ohmura Y, et al (1998) Antiherpesvirus activities of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-yl]methyl]guanine (A-5021) in cell culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42:1666–70. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.7.1666>
278. Lowe DM, Alderton WK, Ellis MR, et al (1995) Mode of action of (R)-9-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)butyl]guanine against herpesviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1802–1808. <https://doi.org/10.1128/aac.39.8.1802>
279. De Clercq E, Naesens L, De Bolle L, et al (2001) Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Reviews in Medical Virology* 11:381–395. <https://doi.org/10.1002/rmv.336>
280. Glorieux S, Vandekerckhove AP, Goris N, et al (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>
281. Vissani MA, 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>
282. De Clercq E (2003) Clinical Potential of the Acyclic Nucleoside Phosphonates Cidofovir, Adefovir, and Tenofovir in Treatment of DNA Virus and Retrovirus Infections. *Clin Microbiol Rev* 16:569. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.569-596.2003>
283. Hitchcock MJM, Jaffe HS, Martin JC, Stagg RJ (1996) Cidofovir, a New Agent with Potent Anti-Herpesvirus Activity. *Antivir Chem Chemother* 7:115–127. <https://doi.org/10.1177/095632029600700301>
284. Andrei G, Snoeck R (2010) Cidofovir Activity against Poxvirus Infections. *Viruses* 2:2803–2830. <https://doi.org/10.3390/v2122803>
285. Gibson JS, Slater JD, Field HJ (1992) The activity of (S)-1-[(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. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(92\)90081-F](https://doi.org/10.1016/0166-3542(92)90081-F)
286. Tallmadge RL, Žygelytė E, Van de Walle GR, et al (2018) Effect of a Histone Demethylase Inhibitor on Equine Herpesvirus-1 Activity In Vitro. *Front Vet Sci* 5:34. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00034>
287. Erice A (1999) Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev* 12:286–297

288. Morillo-Gutierrez B, Waugh S, Pickering A, et al (2017) Emerging (val)ganciclovir resistance during treatment of congenital CMV infection: a case report and review of the literature. *BMC Pediatr* 17:181. <https://doi.org/10.1186/s12887-017-0933-6>
289. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, et al (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>
290. Piret J, Drouot E, Boivin G (2017) Antiviral Drug Resistance in Herpesviruses. In: Berghuis A, Matlashewski G, Wainberg MA, et al (eds) *Handbook of Antimicrobial Resistance*. Springer New York, New York, NY, pp 87–122
291. 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>
292. Sergerie Y, Boivin G (2006) Thymidine Kinase Mutations Conferring Acyclovir Resistance in Herpes Simplex Type 1 Recombinant Viruses. *AAC* 50:3889–3892. <https://doi.org/10.1128/AAC.00889-06>
293. Baldanti F, Underwood MR, Stanat SC, et al (1996) Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. *J Virol* 70:1390–1395. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.3.1390-1395.1996>
294. Schmit I, Boivin G (1999) Characterization of the DNA Polymerase and Thymidine Kinase Genes of Herpes Simplex Virus Isolates from AIDS Patients in whom Acyclovir and Foscarnet Therapy Sequentially Failed. *The Journal of Infectious Diseases* 180:487–490. <https://doi.org/10.1086/314900>
295. Scott GM, Weinberg A, Rawlinson WD, Chou S (2007) Multidrug resistance conferred by novel DNA polymerase mutations in human cytomegalovirus isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 51:89–94. <https://doi.org/10.1128/AAC.00633-06>
296. Reed LJ, Muench H (1938) A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *American Journal of Epidemiology* 27:493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
297. Diallo IS, Hewitson G, Wright L, et al (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>
298. Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, et al (2003) Construction of an Excisable Bacterial Artificial Chromosome Containing a Full-Length Infectious Clone of Herpes Simplex Virus Type 1: Viruses Reconstituted from the Clone Exhibit Wild-Type Properties In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology* 77:1382–1391. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.2.1382-1391.2003>
299. Yoshii H, Somboonthum P, Takahashi M, et al (2007) Cloning of full length genome of varicella-zoster virus vaccine strain into a bacterial artificial chromosome and reconstitution of infectious virus. *Vaccine* 25:5006–5012. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.064>

300. Tai SHS, Niikura M, Cheng HH, et al (2010) Complete genomic sequence and an infectious BAC clone of feline herpesvirus-1 (FHV-1). *Virology* 401:215–227. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.021>
301. Tai S-HS, Holz C, Engstrom MD, et al (2016) In vitro characterization of felid herpesvirus 1 (FHV-1) mutants generated by recombineering in a recombinant BAC vector. *Virus Research* 221:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.001>
302. Zhang Z, Selariu A, Warden C, et al (2010) Genome-Wide Mutagenesis Reveals That ORF7 Is a Novel VZV Skin-Tropic Factor. *PLoS Pathogens* 6:e1000971. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000971>
303. Sampaio KL, Cavnac Y, Stierhof Y-D, Sinzger C (2005) Human Cytomegalovirus Labeled with Green Fluorescent Protein for Live Analysis of Intracellular Particle Movements. *JVI* 79:2754–2767. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2754-2767.2005>
304. Zhang J-H (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* 4:67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>
305. Thiry E, Meurens F, Muylkens B, et al (2005) Recombination in alphaherpesviruses. *Reviews in Medical Virology* 15:89–103. <https://doi.org/10.1002/rmv.451>
306. FALKNER† FG, Moss B (1988) Escherichia coli gpt Gene Provides Dominant Selection for Vaccinia Virus Open Reading Frame Expression Vectors. *J VIROL* 62:6
307. Isaacs SN, Kotwal GJ, Moss B (1990) Reverse guanine phosphoribosyltransferase selection of recombinant vaccinia viruses. *Virology* 178:626–630. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90367-z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90367-z)
308. Lorenzo MM, Galindo I, Blasco R (2004) Construction and Isolation of Recombinant Vaccinia Virus Using Genetic Markers. In: Isaacs SN (ed) *Vaccinia Virus and Poxvirology: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 15–30
309. Marshall DR, Reilly JD, Liu X, Silva RF (1993) Selection of Marek's Disease Virus Recombinants Expressing the Escherichia coli gpt Gene. *Virology* 195:638–648. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1415>
310. Greaves RF, Brown JM, Vieira J, Mocarski ES (1995) Selectable insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome using the Escherichia coli guanosine phosphoribosyl transferase (gpt) gene. *J Gen Virol* 76 (Pt 9):2151–2160. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2151>
311. Morello CS, Cranmer LD, Spector DH (1999) In vivo replication, latency, and immunogenicity of murine cytomegalovirus mutants with deletions in the M83 and M84 genes, the putative homologs of human cytomegalovirus pp65 (UL83). *J Virol* 73:7678–7693. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7678-7693.1999>
312. Nagaike K (2004) Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli. *Vaccine* 22:4069–4074. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.062>
313. Sugahara Y, Matsumura T, Kono Y, et al (1997) Adaptation of equine herpesvirus 1 to unnatural host led to mutation of the gC resulting in increased susceptibility of the

virus to heparin. Archives of virology 142:1849–56.
<https://doi.org/10.1007/s007050050202>

314. Diaz RS, Shytaj IL, Giron LB, et al (2019) Potential impact of the antirheumatic agent auranofin on proviral HIV-1 DNA in individuals under intensified antiretroviral therapy: Results from a randomised clinical trial. *International Journal of Antimicrobial Agents* 54:592–600. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.08.001>
315. Rothan HA, Stone S, Natekar J, et al (2020) The FDA-approved gold drug auranofin inhibits novel coronavirus (SARS-COV-2) replication and attenuates inflammation in human cells. *Virology* 547:7–11. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.05.002>
316. Dapp MJ, Clouser CL, Patterson S, Mansky LM (2009) 5-Azacytidine Can Induce Lethal Mutagenesis in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *JVI* 83:11950–11958. <https://doi.org/10.1128/JVI.01406-09>
317. Diamantopoulos PT, Michael M, Benopoulou O, et al (2012) Antiretroviral activity of 5-azacytidine during treatment of a HTLV-1 positive myelodysplastic syndrome with autoimmune manifestations. *Virol J* 9:1. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-1>
318. Di Veroli GY, Fornari C, Wang D, et al (2016) Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics* 32:2866–2868. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw230>
319. Kappler-Gratias S, Bucher L, Desbois N, et al (2020) A3- and A2B-fluorocorroles: synthesis, X-ray characterization and antiviral activity evaluation against human cytomegalovirus infection. *RSC Med Chem* 11:783–801. <https://doi.org/10.1039/D0MD00127A>
320. Weiss JW, Pitot HC (1974) Inhibition of ribosomal ribonucleic acid maturation by 5-azacytidine and 8-azaguanine in Novikoff hepatoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 160:119–129. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(74\)80016-0](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(74)80016-0)
321. Clerc JC-L (1965) Inhibitory effect of 8-azaguanine on the synthesis of vaccinia virus deoxyribonucleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 108:5–10. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(65\)90102-4](https://doi.org/10.1016/0005-2787(65)90102-4)
322. Luthra P, Anantpadma M, De S, et al (2020) High-Throughput Screening Assay to Identify Small Molecule Inhibitors of Marburg Virus VP40 Protein. *ACS Infect Dis* 6:2783–2799. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00512>
323. Scholar E (2009) Pyrimethamine. In: Enna SJ, Bylund DB (eds) *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, New York, pp 1–6
324. McCarthy JS, Price RN (2015) 40 - Antimalarial Drugs. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds) *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp 495-509.e5
325. Rogée S, Larrous F, Jochmans D, et al (2019) Pyrimethamine inhibits rabies virus replication in vitro. *Antiviral Research* 161:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.016>
326. Galal H. Elgemeie (2003) Thioguanine, Mercaptopurine: Their Analogs and Nucleosides as Antimetabolites. *Current Pharmaceutical Design* 9:2627–2642. <https://doi.org/10.2174/1381612033453677>

327. Yin Y, Chen S, Hakim MS, et al (2018) 6-Thioguanine inhibits rotavirus replication through suppression of Rac1 GDP/GTP cycling. *Antiviral Research* 156:92–101. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.06.011>
328. Swaim CD, Perng Y-C, Zhao X, et al (2020) 6-Thioguanine blocks SARS-CoV-2 replication by inhibition of PLpro protease activities. *bioRxiv* 2020.07.01.183020. <https://doi.org/10.1101/2020.07.01.183020>
329. Johnson DC, Spear PG (1982) Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol* 43:1102–1112. <https://doi.org/10.1128/JVI.43.3.1102-1112.1982>
330. Ghosh Choudhury N, Graham A, Ghosh HP (1987) Herpes Simplex Virus Type 2 Glycoprotein Biogenesis: Effect of Monensin on Glycoprotein Maturation, Intracellular Transport and Virus Infectivity. *JGenVirol* 68 (Pt 7): <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-7-1939>
331. Schlegel R, Willingham M, Pastan I (1981) Monensin blocks endocytosis of Vesicular Stomatitis Virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 102:992–998. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)91636-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)91636-3)
332. Chauhan S, Ahmed Z, Bradfute S, et al (2015) Pharmaceutical screen identifies novel target processes for activation of autophagy with a broad translational potential. *Nature Communications* 6:8620. <https://doi.org/10.1038/ncomms9620>
333. Sharma S, Anand N (1997) Chapter 8 - Benzimidazoles. In: Sharma S, Anand N (eds) *Pharmacochemistry Library*. Elsevier, pp 195–238
334. Chen C-Y, Chang Y-N, Ryan P, et al (1995) Effect of Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Expression Levels on Ganciclovir-Mediated Cytotoxicity and the “Bystander Effect.” *Human Gene Therapy* 6:1467–1476. <https://doi.org/10.1089/hum.1995.6.11-1467>
335. Hamel W, Magnelli L, Chiarugi VP, Israel MA (1996) Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res* 56:2697–2702
336. Doonan GR, Brown CM, Mullaney TP, et al (1989) Monensin poisoning in horses - an international incident. *Can Vet J* 30:165–169
337. Matsuoka T, Novilla MN, Thomson TD, Donoho AL (1996) Review of monensin toxicosis in horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 16:8–15. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(96\)80059-1](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(96)80059-1)
338. Chen Y, Chen S, Pan T, Zou X (2017) Edge effect detection for real-time cellular analyzer using statistical analysis. *RSC Advances* 7:20833–20839. <https://doi.org/10.1039/C6RA26375E>

Annexe 1. Inhibiteurs d'HVE-1 identifiés lors du criblage primaire

Composé	Classe thérapeutique	Taux d'infection	Taux de réplication	Cytotoxicité
Azaguanine-8	Antinéoplasique	13	9	90
Metformine hydrochloride	Antidiabétique	68	68	106
Sulfaphénazole	Antibactérien	67	60	104
Pyriméthamine	Antiparasitaire	37	23	70
Imipramine hydrochloride	Antidépresseur	66	65	117
Thioridazine hydrochloride	Antipsychotique	69	67	109
Amfépramone hydrochloride	Anticonvulsif	64	54	105
Tamoxifène citrate	Antinéoplasique	58	43	113
Chlorzoxazone	Décontractant	48	47	112
Alverine citrate salt	Anticonvulsif	71	62	107
Nifénazone	Analgésique	71	57	108
Carmofur	Antinéoplasique	67	62	107
Thioguanosine	Antinéoplasique	49	34	75
Cloпамide	Anti-hypertenseur	59	47	105
Hycanthone	Antiparasitaire	70	50	95
Clofazimine	Antibactérien	51	36	89
Clomiphène citrate	Hormone	50	53	118
Stanozolol	Stéroïde	67	58	115
Cefaclor hydrate	Antibactérien	79	85	99
Colistin sulfate	Antibactérien	83	87	100
Terconazole	Antifongique	81	82	105
Pyrazinamide	Antibactérien	71	64	102
Lovastatine	Hypocholestérolémique	77	64	88
Nystatine	Antifongique	60	81	105
Thiostrepton	Antibactérien	70	63	89
Ethionamide	Antibactérien	69	70	107
Thiocolchicoside	Anticonvulsif	82	81	105
Ciclopirox éthanolamine	Antibactérien	27	11	73

Trimetazidine dihydrochloride	Vasodilatateur	80	85	100
Hexetidine	Antifongique	73	70	111
Pentamidine isethionate	Antiparasitaire	71	75	107
Nifuroxazide	Antibactérien	79	101	107
Tazarotene	Antipsoriatique	79	83	101
Mevastatine	Hypocholestérolémique	72	60	90
Nicotinamide	Vitamine	68	76	102
Camylofine chlorhydrate	Décontractant	85	71	104
Voriconazole	Antifongique	82	64	101
Zafirlukast	Antiasthmatique	56	80	116
Butenafine Hydrochloride	Antifongique	51	74	116
Mercaptopurine	Immunosuppresseur	83	65	91
Benazepril hydrochloride	Antihypertenseur	71	85	98
Dipivefrin hydrochloride	Anti-glaucome	49	61	123
Penciclovir	Antiviral	51	56	111
Monensine	Antibactérien	3	2	108
Auranofine	Analgésique	16	12	81
Ganciclovir	Antiviral	12	4	108
Azacytidine-5	Antinéoplasique	6	44	88
Flubendazole	Antiparasitaire	41	20	76
Monobenzone	Traitement dépigmentation	92	66	102
Cyclopenthiazide	Antihypertenseur	71	58	105
Fluticasone propionate	Vasodilatateur	56	45	105
Halofantrine hydrochloride	Antiparasitaire	66	61	107
Nomegestrol acetate	Contraceptif	62	50	115
Zalcitabine	Antiviral	71	53	110
Methantheline bromide	Anticonvulsif	71	61	105
Topiramate	Anticonvulsif	66	65	109
Sarafloxacin	Antibactérien	68	67	106
Clonixin Lysinate	Analgésique	73	77	114
Parbendazole	Antiparasitaire	41	30	99
Viomycin sulfate	Antibactérien	70	65	110
Formoterol fumarate	Antiasthmatique	96	65	113

Hexachlorophène	Antiseptique	33	44	110
Aminacrine	Antiseptique	74	43	94

Annexe 1. Composés inhibiteurs d'HVE-1 identifiés lors du criblage primaire.

L'activité antivirale et la cytotoxicité des 63 composés identifiés lors du criblage primaire sont présentés. Les valeurs de taux d'infection, de réplication et de cytotoxicité correspondent aux valeurs après normalisation sur les contrôles DMSO et s'expriment en pourcentage. En bleu sont indiqués les composés sélectionnés pour la suite de l'étude.

Annexe 2. Activateurs d'HVE-1 identifiés lors du criblage primaire

Composé	Classe thérapeutique	Taux d'infection	Taux de réplication	Cytotoxicité
Niclosamide	Antiparasitaire	126	131	85
Isoxsuprine hydrochloride	Vasodilatateur	129	139	101
Pheniramine maleate	Antihistaminique	130	129	93
Picotamide monohydrate	Anticoagulant	137	138	93
Triamcinolone	Immunosuppresseur	140	139	87
Dexamethasone acetate	Immunosuppresseur	139	140	88
Isoniazid	Antibactérien	139	104	98
Methylprednisolone, 6-alpha	Antiinflammatoire	153	171	79
Quinacrine dihydrochloride hydrate 04H09	Antiparasitaire	167	112	93
Bupivacaine hydrochloride	Analgésique	115	147	95
Erlotinib	Antinéoplasique	148	120	85
Cyclosporin A	Immunosuppresseur	153	122	87
Serotonin hydrochloride	Neurotransmetteur	122	117	94
Ceftazidime pentahydrate	Antibactérien	121	112	96
Iobenguane sulfate	Antinéoplasique	118	128	92
Metixene hydrochloride	Antiparkinsonien	129	86	97
Nitrofurantoin	Antibactérien	121	108	92
Omeprazole	Antiulcères	123	113	92
Artemisinin	Antiparasitaire	134	120	94
Ethamivan	Analeptique	139	159	91
Cetirizine dihydrochloride	Antihistaminique	120	110	94
Sibutramine hydrochloride	Traitement de l'obésité	121	134	88
Cyclizine hydrochloride	Antihistaminique	122	128	93
Sulfasalazine	Antibactérien	124	135	98
Pirenperone	Antipsychotique	123	107	99

Phenacetine	Analgésique	126	100	100
Betahistine mesylate	Vasodilatateur	121	113	95
Mometasone furoate	Antiinflammatoire	128	118	93
Ropinirole hydrochloride	Antiparkinsonien	121	142	94
Lacidipine	Antihypertenseur	128	134	96
Azelastine hydrochloride	Antihistaminique	135	128	94
Ipsapirone	Antidépresseur	142	164	94
Demecarium bromide	Anti-glaucome	89	138	97
Merbromine	Antibactérien	135	140	99
Verteporfine	Traitement DMLA	131	562	91
Felbamate	Antiépileptique	134	116	91
Algestone acetophenide	Contraceptif	141	151	83
Phenprobamate	Anticonvulsif	157	119	97
Pregabaline	Anticonvulsif	141	138	87
Besifloxacin hydrochloride	Antibactérien	146	135	86
Ritonavir	Antiviral	135	141	90

Annexe 2. Composés activateurs d'HVE-1 identifiés lors du criblage primaire.

L'activité antivirale et la cytotoxicité des 41 composés identifiés lors du criblage primaire sont présentés. Les valeurs de taux d'infection, de réplication et de cytotoxicité correspondent aux valeurs après normalisation sur les contrôles DMSO et s'expriment en pourcentage.

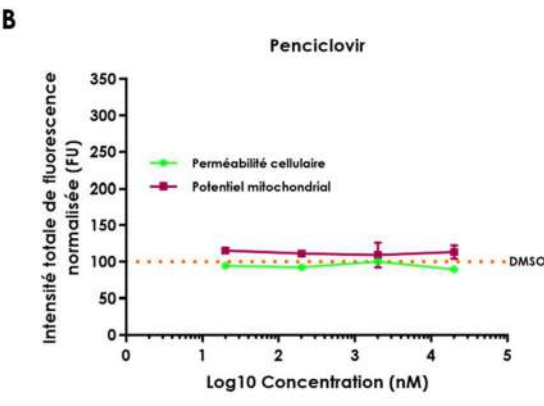
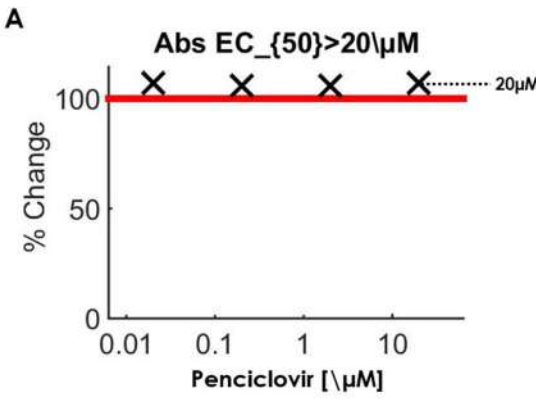
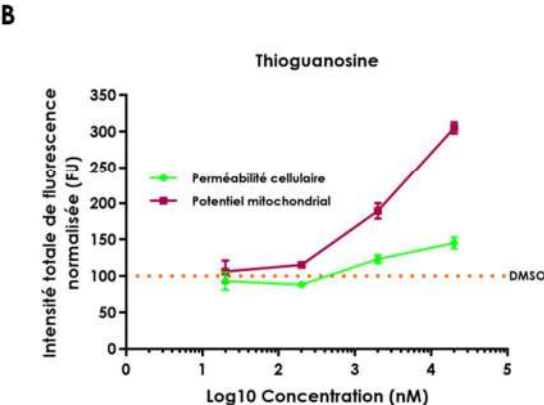
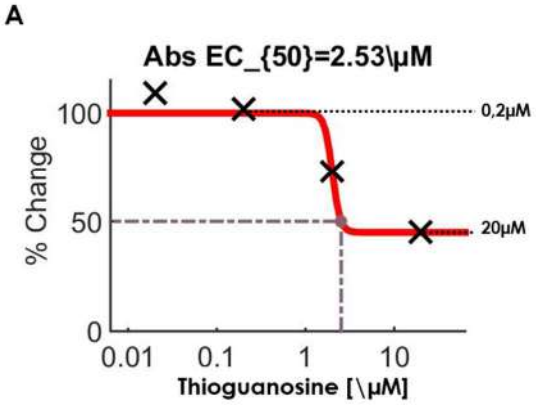
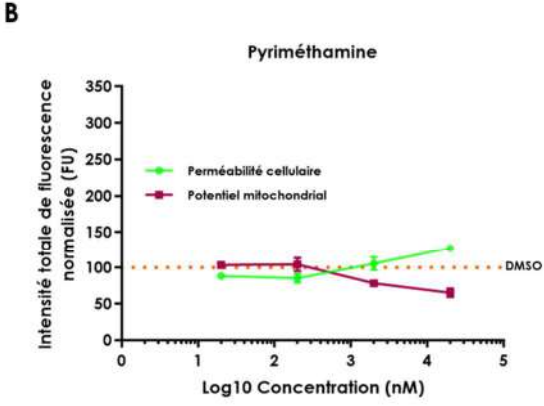
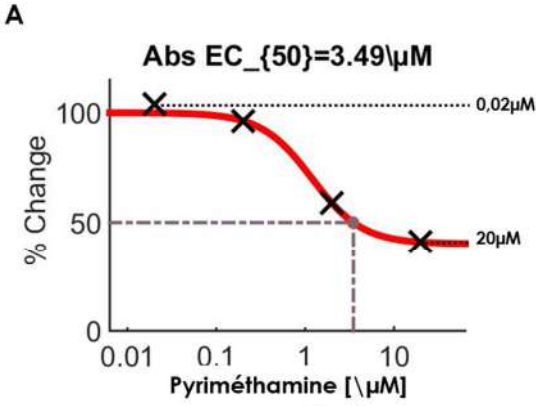
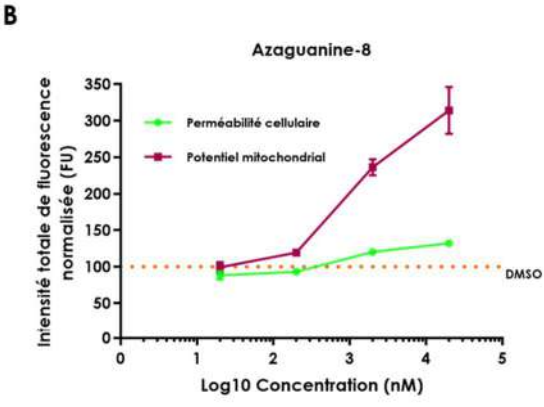
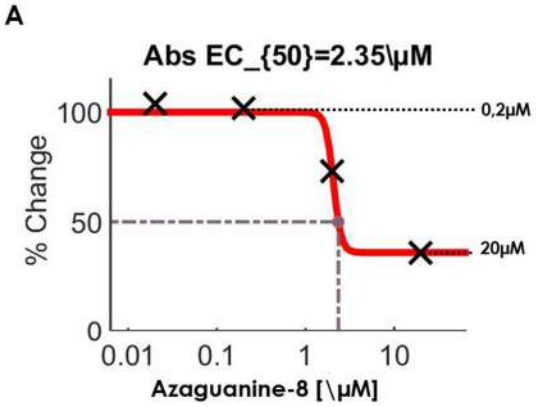
Annexe 3. Résultats du criblage secondaire

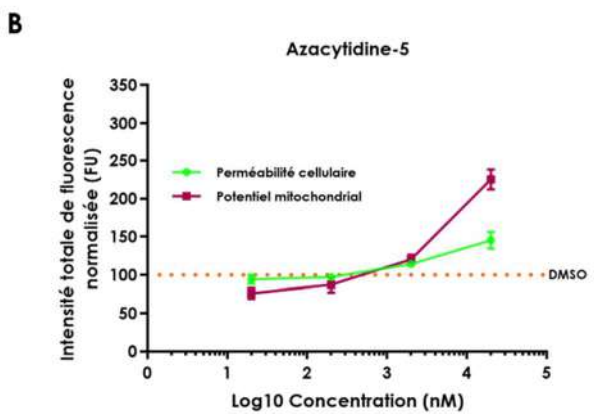
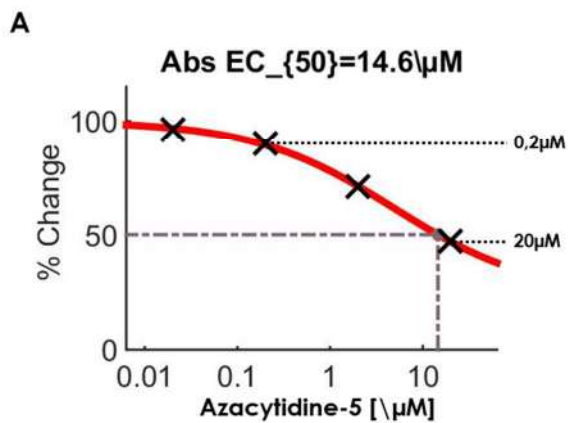
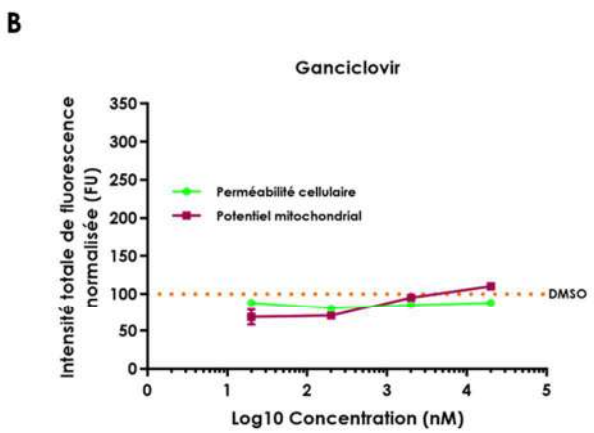
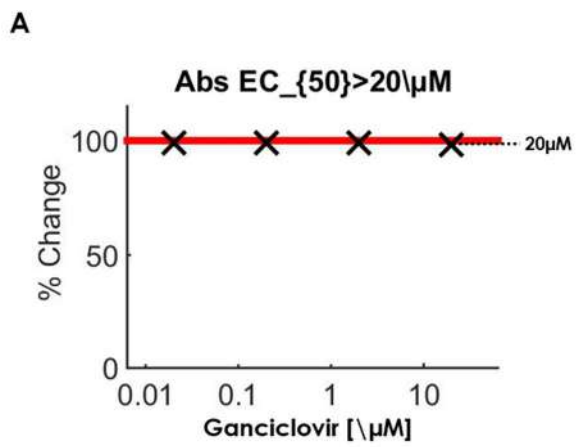
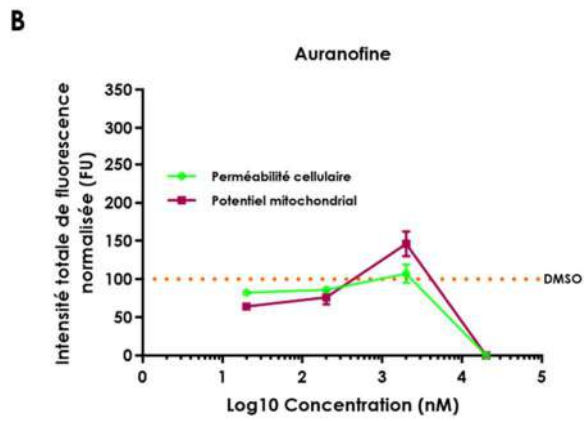
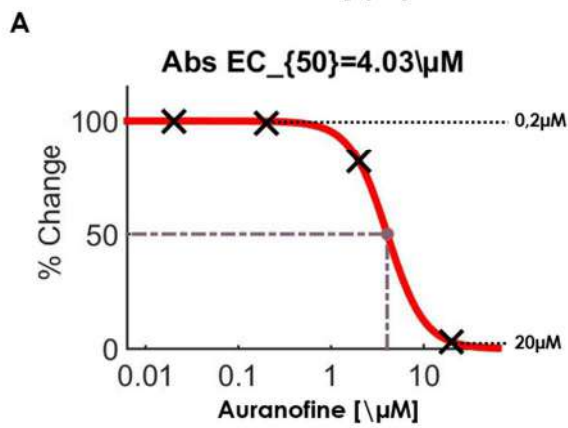
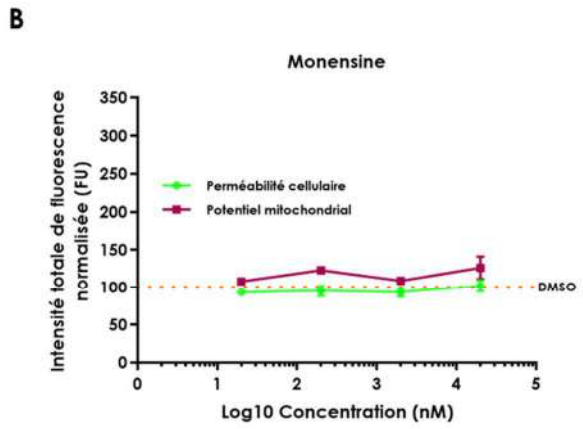
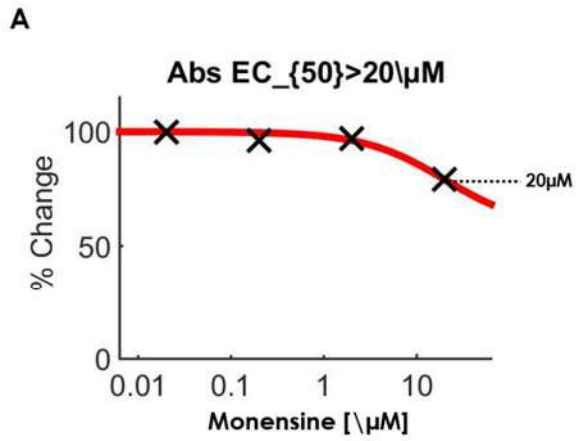
Composé	Classe thérapeutique	Taux d'infection	Taux de réplication	Cytotoxicité
Azaguanine-8	Antinéoplasique	17	9	89
Pyriméthamine	Antiparasitaire	21	11	66
Tamoxifène citrate	Antinéoplasique	80	81	90
Chlorzoxazone	Décontractant	73	68	115
Thioguanosine	Antinéoplasique	54	32	66
Clopamide	Anti-hypertenseur	102	93	94
Clofazimine	Antibactérien	108	74	86
Clomiphène citrate	Hormone	60	67	101
Ciclopirox éthanolamine	Antibactérien	113	59	53
Penciclovir	Antiviral	51	53	108
Monensine	Antibactérien	4	3	96
Auranofine	Analgésique	58	70	100
Ganciclovir	Antiviral	17	6	114
Azacytidine-5	Antinéoplasique	61	49	74
Flubendazole	Antiparasitaire	34	19	75
Fluticasone propionate	Vasodilatateur	130	129	92
Parbendazole	Antiparasitaire	53	44	80
Hexachlorophene	Antiseptique	56	71	94

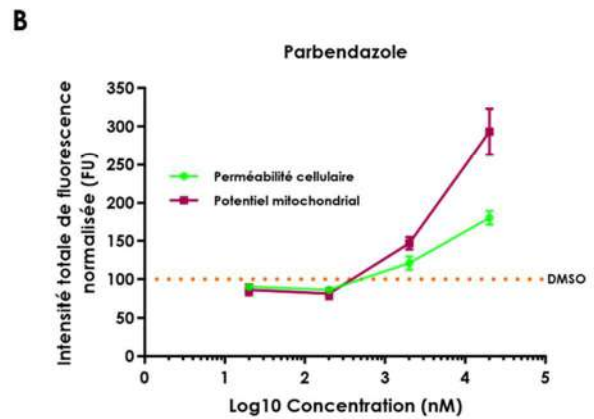
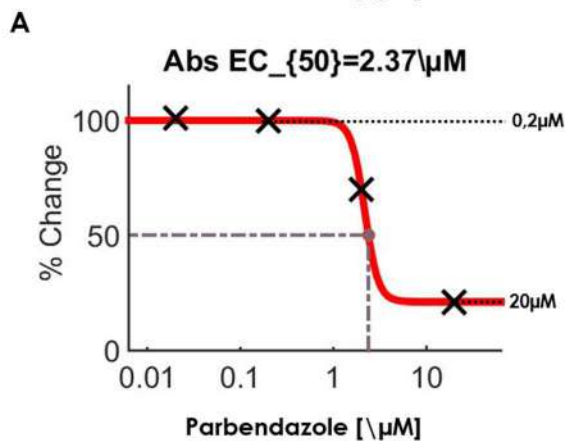
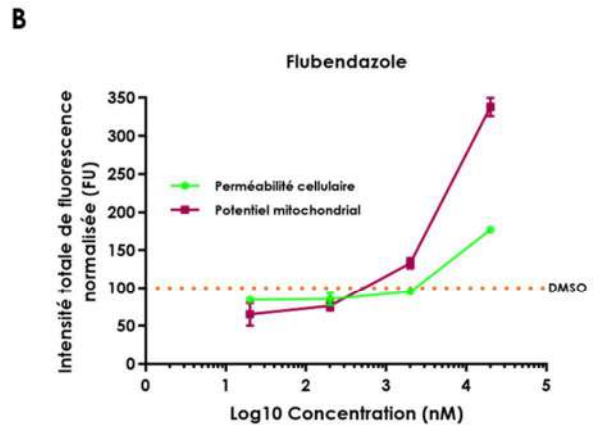
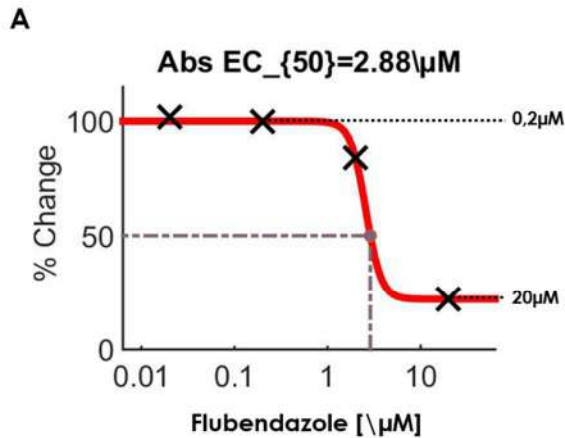
Annexe 3. Activité des 18 composés anti-HVE-1 inclus dans le criblage secondaire.

L'activité antivirale et la cytotoxicité des 18 composés sélectionnés à la suite du criblage primaire sont présentés. Les valeurs de taux d'infection, de réplication et de cytotoxicité correspondent aux valeurs après normalisation sur les contrôles DMSO et s'expriment en pourcentage. En bleu sont indiqués les composés dont la fenêtre thérapeutique a été déterminée.

Annexe 4. Cytotoxicité des composés







Annexe 4. Cytotoxicité des 10 composés anti HVE-1.

A. Exemple de CC50 obtenue pour une expérience indépendante. B. Graphes représentant la perméabilité cellulaire (vert) ou le potentiel mitochondrial (violet) normalisé selon les concentrations de composé. Les concentrations sont exprimées en nM et sont représentées en log10. La ligne en pointillés orange correspond à la valeur normalisée des contrôles DMSO. Les données correspondent à la moyenne et l'écart-type des triplicats d'une seule expérience.

Annexe 5. Inhibiteurs d'HVE-1 identifiés par quantification automatisée des syncytia

Composé	Classe thérapeutique	Nombre de syncytia normalisé	Cytotoxicité
Azaguanine-8	Antinéoplasique	11	90
Pyriméthamine	Antiparasitaire	21	70
Pioglitazone	Antidiabétique	39	98
Amfepramone hydrochloride	Anticonvulsif	45	105
Erythromycine	Antibactérien	6	116
Chlorzoxazone	Anticonvulsif	37	112
Proglumide	Antiulcères	27	102
Thioguanosine	Antinéoplasique	31	72
Clofazimine	Antibactérien	28	89
Probucol	Antilipémique	57	116
Dequalinium dichloride	Antibactérien	45	78
Pitavastatin calcium	Hypocholestérolémique	51	84
Thiostrepton	Antibactérien	52	89
Ciclopirox éthanolamine	Antibactérien	17	73
Mercaptopurine	Immunosuppresseur	36	91
Penciclovir	Antiviral	40	111
Monensine	Antibactérien	1	108
Auranofine	Analgésique	1	83
Ganciclovir	Antiviral	4	108
Methiazole	Antiparasitaire	20	105
Parbendazole	Antiparasitaire	10	99

Annexe 5. Composés inhibiteurs d'HVE-1 identifiés par quantification automatisée des syncytia

Activité antivirale et cytotoxicité des 21 composés identifiés lors du criblage primaire analysé par l'algorithme de quantification de l'effet cytopathique. Les valeurs correspondent aux valeurs après normalisation sur les contrôles DMSO et s'expriment en pourcentage. En bleu sont indiqués les composés communs aux deux méthodes de quantification.

Résumé

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires pouvant avoir un fort impact sur la santé humaine et animale. Avec l'apparition du SIDA, la recherche de molécules antivirales pour la médecine humaine a connu une forte expansion depuis les années 1980. Malheureusement, la recherche de traitements antiviraux pour la santé animale n'a pas connu la même progression. Ainsi, afin de proposer une réponse plus adaptée aux maladies virales animales et d'être en mesure de lutter contre les maladies émergentes, dont la majorité sont virales et zoonotiques, il est nécessaire d'amplifier la recherche antivirale en médecine vétérinaire.

Dans cette thèse, deux nouvelles méthodes d'études ont été développées afin d'identifier de nouvelles molécules efficaces contre les alphaherpèsvirus et de disposer d'outils plus performant d'exploration du cycle viral. Le développement d'un herpèsvirus équin ANCHOR™ et de méthodes de quantification automatisées de l'effet cytopathique a ainsi permis de tester plus de 1280 composés lors d'une campagne de criblage à haut débit. Grâce à cette campagne de criblage, 12 composés ont démontré une activité antivirale contre l'herpèsvirus équin de type 1 et pourraient constituer un nouveau point de départ pour lutter contre la rhinopneumonie équine.

Abstract

Viruses are intracellular parasites that can have a huge impact on human and animal health. With the emergence of AIDS, the search for antiviral compounds for human medicine has expanded rapidly since the 1980s. Unfortunately, antiviral research for veterinary medicine has not experienced the same progression. However, in order to provide more appropriate treatments against animal viral diseases, and to be able to fight emerging diseases, the majority of which are viral and zoonotic, it is necessary to develop veterinary antiviral research.

In this thesis, two methods for viral quantification were developed to gain better knowledges and discover new antiviral treatments against alphaherpesviruses. The construction of the ANCHOR-tagged equine herpesvirus 1 and the development of automated quantification of cytopathic effect enabled a high content screening campaign of more than 1280 compounds and the identification of 12 new antivirals compounds against equine herpesvirus 1, which may represent a new starting point to fight against equine rhinopneumonitis.