

EVALUATION *IN VITRO* ET *EX VIVO* DES CAPACITÉS VIRUCIDES ET ANTIVIRALES D'UN BIOFLAVONOÏDE FACE À L'HERPES VIRUS ÉQUIN DE TYPE 1

Alexandra Scipioni, Tatiana Art, Lorène Dams, Briec de Moffarts, Pierre Lekeux et Etienne Thiry

Ce texte est la vulgarisation d'une étude scientifique qui a été partiellement présentée lors du congrès Hippos 2008. (Scipioni et al, 2008)

L'étude a été placée sous l'autorité du professeur Etienne Thiry (service de virologie de la faculté de médecine vétérinaire de Liège) et conduite en association avec le Docteur Tatiana Art (service de physiologie de la faculté de médecine vétérinaire de Liège). Elle avait pour but l'évaluation des capacités virucides et antivirales d'un bioflavonoïde. Cette étude a été partiellement financée par TWYDIL®.

Cette étude a permis de démontrer :

In vitro : une activité virucide importante du bioflavonoïde et une certaine activité de celui-ci sur les processus de multiplication virale, qui reste à confirmer.

Ex vivo : suite à une administration *per os* de ce bioflavonoïde, certains liquides biologiques ont montré une activité virucide significative.

INTRODUCTION

Les relations entre pathologies virales, inflammation et performance sont de plus en plus étudiées tant chez le sportif humain que chez le cheval. Il faut rappeler que chez ce dernier, les affections du système

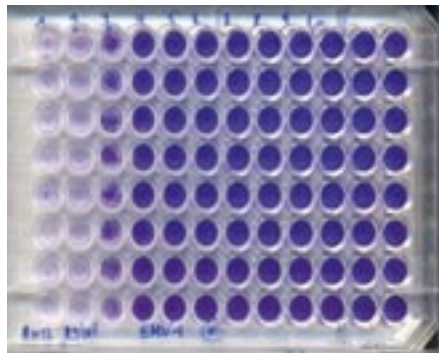
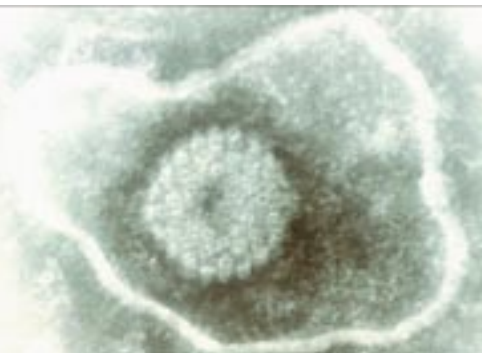


respiratoire sont la deuxième cause de pauvres performances sportives. Parmi ces affections, les infections virales prennent une part non négligeable (elles ont été en partie développées dans l'article qui précède : page : 4-9), nous allons revoir très succinctement les implications liées à l'herpès virus équin de type 1 (EHV-1).

L'EHV-1 (famille des *Herpesviridae*) est un pathogène majeur du cheval. Présent à l'état endémique dans le monde, il est responsable d'avortements et

de myéloencéphalopathies tandis que l'EHV-4 est responsable de la rhinopneumonie. Malgré l'existence de vaccins contre l'EHV-1 (et la protection croisée qu'ils confèrent face à l'EHV-4), le cheval n'est pas totalement protégé contre ces infections.

Il y a de nombreuses années, des molécules antivirales ont été développées pour traiter les infections liées aux herpès virus humain. Leur efficacité contre l'EHV-1 avait été testée et bien que les résultats *in vitro* aient été encourageants, les résultats



La deuxième phase de l'étude s'est intéressée à montrer un effet éventuel du flavonoïde circulant dans le plasma et/ou le lavage broncho-alvéolaire (BAL) après administration orale de l'extrait de complément alimentaire, pendant 7 jours, à 6 chevaux hébergés en conditions standardisées.

Afin d'éviter des interférences entre l'effet du complément et la présence potentielle d'anticorps contre l'EHV-1 (les chevaux pourraient en effet être déjà immunisés contre ce virus et ce à des degrés variables), le virus utilisé pour cette phase était le virus de la maladie d'Aujeszky (suid herpes virus 1 ; SuHV-1), appartenant à la même famille que l'EHV-1. Toutes les expériences réalisées avec l'EHV-1 ont été validées avec le SuHV-1. Ceci permet de ne tenir compte que des effets du flavonoïde et non des anticorps potentiellement en présence.

Des prélèvements de sang et des lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés à trois moments (J- 1, J0 et J+7) et leur effet virucide a été testé.

Ces prélèvements se sont déroulés comme suit :

- J-1 : sang et BAL prélevés comme contrôle
- J0 : sang prélevé (4 heures après la première administration)
- J+7 : sang et BAL prélevés (4 heures après la dernière administration)

L'objectif était de voir si, suite à

in vivo furent malheureusement décevants. Suite à ces constatations, la recherche de molécules capables d'aider, prévenir ou lutter contre les infections virales du cheval fût de plus en plus intense. Différents extraits de plantes riches en flavonoïde ont montré une certaine activité face à des virus humains (HIV, herpès virus, ...).

Rappelons peut-être à ce stade que les affections virales du cheval, qu'elles soient cliniques ou sub-cliniques, engendrent des pertes économiques très importantes qui peuvent même être catastrophiques pour l'économie d'un pays tout entier (AQUIS report 2009).

PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE :

L'étude s'est déroulée en deux phases, une première *in vitro* et une deuxième *ex vivo*.

1. Etude *in vitro*

L'activité antivirale du composé contenant des flavonoïdes. Son effet (virucide et sur la multiplication virale) face à l'EHV-1 a été évalué sur lignée de cellules RK13 par mesure de la réduction du titre viral.

Ce travail s'est déroulé en plusieurs étapes :

- La mise en suspension du composé en testant différents solvants ;
- La mesure de la cytotoxicité des solvants et du composé solubilisé sur culture de cellules RK13 ;
- L'évaluation de l'effet virucide des composés :

Le principe est de mesurer l'effet virucide éventuel des suspensions de flavonoïdes sur l'EHV-1 en culture de cellules RK13. Pour

Figure 1 : culture cellulaire (RK13) infectée par l'EHV-1 en dose décroissante de gauche à droite (plaque de dénombrement par la méthode DICC₅₀.)

cela, l'échantillon est ajouté à la suspension virale avant d'infecter le tapis cellulaire. Différents temps de contact (allant de 10 secondes à 30 minutes) ont été testés.

Le titre viral est mesuré après 3 jours d'incubation par la méthode de la dose infectieuse en culture de cellules responsables de 50% de lyse des supports cellulaires (DICC₅₀).

L'évaluation de l'action du composé, sur la multiplication du virus :

L'objectif est de mesurer l'effet du composé sur la multiplication de l'EHV-1 en culture de cellules RK13. Différentes concentrations du composé ont été mises en contact avec les cellules au moment de l'infection virale. Deux jours plus tard, on recherche sur les boîtes de culture l'apparition des effets cytopathogènes caractéristiques de ces virus (syncytium et plages de lyse).

2. Etude *ex vivo*

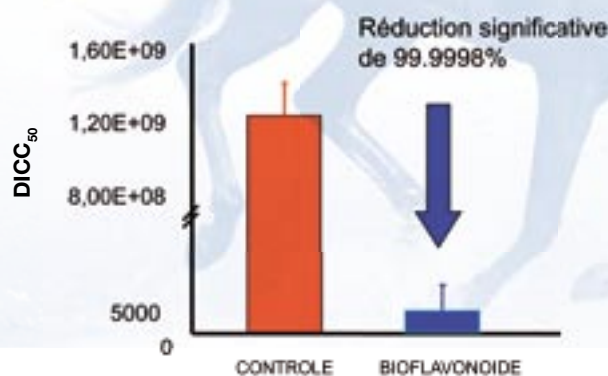
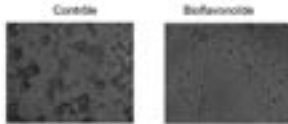
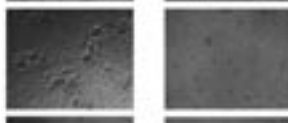


Figure 2 : Réduction du titre viral après mise en contact « *in vitro* » du bioflavonoïde avec l'EHV-1.

MOI 0,01
Dilution 10x du
bioflavonoïde



Dilution 100x du
bioflavonoïde



Dilution 1000x du
bioflavonoïde



Figure 3 : observation après 24 heures des effets cytopathogènes induits en culture de cellules par l'EHV-1 pré-incubé avec ou sans bioflavonoïde. MOI : multiplicity of infection, représente le nombre de particules virales par cellule

une absorption orale, le flavonoïde était présent dans le sang et/ou dans le BAL et s'il s'y retrouvait à une concentration suffisante pour obtenir un effet virucide *ex vivo*. Le mode opératoire est en tout point similaire aux tests *in vitro*, en y incluant les contrôles d'usage.

RESULTATS DE L'ÉTUDE

1. Etude *in vitro*

Après vérification, les conditions expérimentales se sont avérées adéquates. La figure 1 représente une plaque de dénombrement du EHV-1 sur cellules RK13 après inoculation par le virus EHV-1. Les zones bleues indiquent que les cellules sont présentes et les zones blanches que les cellules ont été lysées.

L'effet virucide du composé sur l'EHV-1 s'est avéré significatif. Seules dix secondes de contact à une concentration de 0.125 µg/ml ont suffi à réduire le titre viral de presque 100 %. La figure 2 illustre ces résultats.

Les résultats obtenus laissent penser qu'un effet du composé sur la multiplication virale serait possible. La figure 3 indique l'absence de réaction cytopathogène de l'EHV-1 sur les cellules RK13 en culture lorsque le bioflavonoïde est inclus dans le milieu de culture. Toutefois, l'effet virucide pourrait interférer avec un effet sur la multiplication virale. *Ces résultats indiquent clairement un effet virucide et laissent penser qu'un effet sur la multiplication virale du bioflavonoïde existe. Ce dernier effet devra faire l'objet*

d'études complémentaires afin d'en caractériser le mécanisme d'action éventuel.

2. Etude *ex vivo*

Rappelons-nous que l'activité virucide du sang et du BAL a été testée par les mêmes méthodes que développées précédemment mais en utilisant le virus de la maladie d'Aujeszky (SuHV-1) en remplacement de l'EHV-1. Les résultats des dénombrements ont été comparés avec ceux des contrôles. Ils sont repris dans les figures 4 et 5. Avec le plasma aucun effet virucide significatif n'a pu être montré à J0 (soit 4h après la première administration orale du bioflavonoïde). Par contre à J+7 une réduction significative du titre viral a été observée aussi bien avec le plasma qu'avec le lavage broncho-alvéolaire.

Dans cette phase de l'étude, l'utilisation du SuHV-1 nous protège d'un biais qui serait dû à la présence d'anticorps contre l'EHV-1. Mais une autre source d'erreur possible est la présence du virus EHV-1 lui-

Figure 4 : Réduction du titre viral après mise en contact des liquides de lavage broncho-alvéolaire *ex vivo* avec l'EHV-1

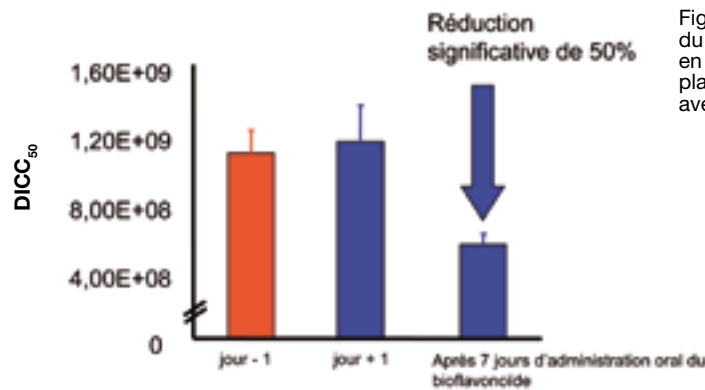
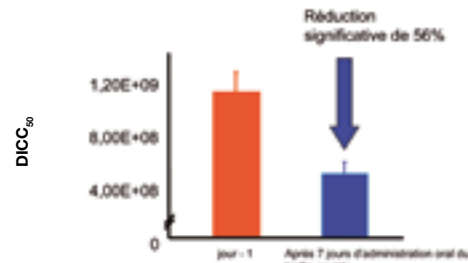


Figure 5 : Réduction du titre viral après mise en contact des liquides plasmatiques *ex vivo* avec l'EHV-1

même ! Si tel était le cas, le virus pourrait lyser les cellules RK13 en contact et induire un résultat faux-positif. Pour éliminer ce risque, les échantillons de sang et de BAL ont été préalablement mis en contact avec les cellules RK13 sans ajouter le virus SuHV-1. Aucun effet cytopathogène n'a été observé, ce qui atteste que les animaux n'étaient pas en phase d'excrétion virale.

Les chercheurs ont par ailleurs essayé de mesurer la concentration du flavonoïde dans les liquides physiologiques et de façon assez surprenante, la concentration n'a pas changé de façon significative au cours de l'expérience

Suite à une administration orale du composé, l'activité virucide des liquides biologiques face à l'EHV-1 a été observée.

L'ensemble des résultats nous permet de penser que l'activité virucide observée est due à la présence dans le sang de métabolites du bioflavonoïde (ceux-ci n'ayant toutefois pas été recherchés au cours de l'étude)

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Cette étude a permis de démontrer :

In vitro : que le bioflavonoïde possède une activité virucide et qu'il aurait un effet sur les processus de multiplication virale.

Ex vivo : que suite à l'administration orale du bioflavonoïde, certains liquides biologiques ont présenté une activité virucide significative.



QUESTIONS AU PROFESSEUR ETIENNE THIRY

HPH: Ces résultats sont-ils surprenants ? Est-il fréquent de trouver ce type d'activité ?

Prof. E. Thiry: Le niveau de virucidie observé *in vitro* est très important. D'autres études ont montré ce type d'activité envers des virus, mais il est vrai que, jusqu'à présent, ce type d'effet avait été étudié pour des bactéries et non des virus. Ces résultats prometteurs permettent d'envisager un effet chez le cheval infecté par l'EHV-1.

HPH: Une activité antivirale a été mise en évidence mais quel est, à votre avis, le mode d'action de la molécule ?

Prof. E. Thiry: Il est prématuré de préciser le mode d'action antiviral de la molécule, car certains résultats doivent être confirmés. Concernant l'effet virucide, l'inactivation des virus est probablement due à un effet des flavonoïdes sur l'enveloppe externe des virus.

HPH: Ce type de dérivés pourrait-il être actif face à d'autres virus tel que, par exemple, le virus influenza ou face à des virus d'autres espèces animales?

Prof. E. Thiry: Si l'action se situe au niveau de l'enveloppe virale, il se pourrait alors que le bioflavonoïde ait un effet sur d'autres virus enveloppés, comme les virus influenza. Des études particulières sont cependant nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

HPH: Quelles perspectives ce type de recherche peut-il ouvrir ?

Prof. E. Thiry: La vaccination est la seule voie de prévention des maladies virales chez le cheval à l'heure actuelle. Elle pourrait donc être utilement complétée par l'utilisation de substances à effet virucide, voire antiviral, qui offrent la perspective de traiter les chevaux, principalement de manière préventive avant qu'ils ne soient placés dans des environnements à risque d'infection.

BIBLIOGRAPHIE

Song J.M. and Seong B.L. Tea Catechins as a potential alternative anti-infectious agent. 2007. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 5; 497-506.

Whalley J. M., Robertson G. R., Scott N. A., Hudson G. L., Bell C. W. and Woodworth, L. M. Identification and nucleotide sequence of a gene in equine herpesvirus 1 analogous to the herpes simplexvirus gene encoding the major envelope glycoprotein B. 1989. *J. Gen. Virol.* 70; 383-394.

Scipioni A., Dams L., de Moffart B., Thiry E.,: In vitro susceptibility of equine herpesvirus type 1 to two feed additives containing flavonoids. In proceedings: Hippos congress, Liège, Belgium, 2008 (poster communication).

de la Fentes R., Awan A.R. and Field H.J. The acyclic nucleoside analogue penciclovir is a potent inhibitor of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in tissue culture and in murine model. 1992. *Antiv. Res.*, 18; 78-89.

Barrandeguy M., Vissani A., Ortiz C., Becerra L., Miño S., Pereda A., Oriol J., Thiry E. Experimental reactivation of equid herpesvirus 3 following corticosteroid treatment. *Equine Vet. J.*, 2008, 40, doi: 10.2746/042516408X333399.

Fortier G., Pronost S., Miszczak F., Fortier C., Léon A., Richard E., Van Erck E., Thiry E., Lekeux P. Identification of equid herpesvirus 5 in respiratory liquids: a retrospective study of 785 samples taken in 2006-2007. *Vet. J.*, 2008, doi:10.1016/j.tvjl.2008.07.004.