



Développement de modèles d'infection de cellules neurales équine par des arbovirus neurotropes et contribution à l'identification de molécules antivirales pour le traitement des encéphalites équine à virus West Nile

Marielle Cochet-Bernoin

► To cite this version:

Marielle Cochet-Bernoin. Développement de modèles d'infection de cellules neurales équine par des arbovirus neurotropes et contribution à l'identification de molécules antivirales pour le traitement des encéphalites équine à virus West Nile. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ021 . tel-04494993

HAL Id: tel-04494993

<https://hal.inrae.fr/tel-04494993>

Submitted on 16 Mar 2024

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.

Développement de modèles d'infection de cellules neurales équine par des arbovirus neurotropes et contribution à l'identification de molécules antivirales pour le traitement des encéphalites équine à virus West Nile

Development of equine brain cell infection models by neurotropic arboviruses and contribution to the identification of antiviral molecules for the treatment of West Nile virus encephalitis in horses.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué (ITFA).

Spécialité de doctorat : Microbiologie.

Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de Pharmacie.

Thèse préparée dans l'unité mixte de recherche **UMR Virologie**, Anses, INRAE, EnvA, Université Paris-Est, sous la direction de **Muriel COULPIER**, Directrice de Recherche, INRAE

Thèse soutenue à Maisons-Alfort, le 9 juin 2023, par

Marielle BERNOIN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Stéphane BIACCHESI

Directeur de Recherche, INRAE-
Jouy-En-Josas-Antony

Président

Fabienne ARCHER

Directrice de Recherche, INRAE-
LYON

Rapporteur & Examinatrice

Stéphane PRONOST

Directeur de Recherche, LABÉO-
CAEN

Rapporteur & Examinateur

Gaelle GONZALEZ

Chef de projet, Anses-Maisons-
Alfort

Examinatrice

Titre : Développement de modèles d'infection de cellules neurales équine par des arbovirus neurotropes et contribution à l'identification de molécules antivirales pour le traitement des encéphalites équine à virus West Nile.

Mots clés : Encéphalites, virus, antiviraux, équin, cellules neurales, imagerie cellulaire

Résumé : Les encéphalites virales équine sont une préoccupation pour la filière équine (cinquième cause de mortalité) et représentent une menace sanitaire et économique importante pour celle-ci. Parmi les virus en cause : le virus West Nile (WNV). Il s'agit d'un arbovirus de la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus*, transmis par les moustiques et responsable d'encéphalites pouvant être fatales ou conduisant à de graves séquelles neurologiques chez le cheval mais aussi chez l'homme. Le WNV est actuellement endémique sur tous les continents ; il voit sa zone de distribution s'étendre en Europe et depuis une vingtaine d'année, il est considéré comme un virus ré-émergent. Chez le cheval, bien que des vaccins soient disponibles, la couverture vaccinale est faible et aucun traitement thérapeutique n'est disponible. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était d'identifier des molécules antivirales pouvant bloquer la réplication du WNV dans le cerveau des chevaux.

Ces dernières années, de nombreuses études ont visé à identifier des molécules antivirales. Mais pour beaucoup, des modèles cellulaires peu pertinents physiologiquement (lignées cellulaires humaines par exemple) ont été utilisés. Les résultats obtenus peuvent ainsi, ne pas être transposables aux cellules du système nerveux des chevaux. Aussi, pour être en mesure d'identifier des molécules présentant un plus fort potentiel antiviral dans le système nerveux des équidés, notre premier objectif a été de développer un modèle cellulaire d'infection par WNV, basé sur des cellules neurales équine dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Grâce à ce nouveau modèle, nous avons pu réaliser notre second objectif : un crible phénotypique d'une petite banque de 45 molécules sélectionnées. Ce crible a révélé que des molécules, déjà connues pour bloquer

la réplication de WNV dans d'autres modèles, se comportaient, soit de la même manière dans les cellules neurales équine (cas du 2'CMC), soit au contraire, qu'elles n'avaient aucune activité antivirale dans ces cellules (cas du favipiravir et sofosbuvir) ou encore, de façon étonnante, qu'elles avaient un rôle opposé à celui attendu (cas des statines). Ces derniers résultats nous ont conduits à initier une recherche visant à comprendre les mécanismes sous-tendant des rôles opposés dans des cellules d'origine humaine ou équine.

Avec pour objectif d'être en mesure d'identifier des molécules antivirales à large spectre, nous avons également initié des premiers travaux avec le virus de l'encéphalite équine de l'est (EEEV). Cet autre arbovirus neurotrope zoonotique responsable d'encéphalites mortelles chez l'homme et les équidés, appartient à la famille des *Togaviridae*, genre *Alphavirus*. Il est présent exclusivement sur le continent américain à l'heure actuelle. Nos résultats ont montré que les cellules neurales progénitrices équine (eNPC) sont fortement permissives à EEEV fournissant un nouveau modèle d'infection qui pourra être utilisé à l'avenir pour tester le potentiel antiviral de petites molécules.

Ce travail a donc permis 1/de mettre en place deux nouveaux modèles d'infection par des arbovirus équine appartenant à deux familles différentes (WNV et EEEV), 2/de développer des tests automatisés en microplaques basés sur de l'imagerie cellulaire et 3/de confirmer ou d'infirmer le rôle antiviral, dans des cellules du système nerveux des équidés, de molécules sélectionnées. Nos résultats ont également souligné l'importance d'utiliser des modèles *in vitro* physiologiquement pertinents pour évaluer le potentiel antiviral des molécules.

Title : Development of equine brain cell infection models by neurotropic arboviruses and contribution to the identification of antiviral molecules for the treatment of West Nile virus encephalitis in horses

Keywords : encephalitis; virus; neural cells; antivirals; equine; cells imaging

Abstract : Equine viral encephalitis are of great concern for the equine industry (fifth cause of mortality) and represent a significant health and economic threat for the industry. Among the viruses involved is the West Nile virus (WNV). It is an arbovirus of the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*, transmitted by mosquitoes and responsible for encephalitis that can be fatal or lead to serious neurological sequelae in horses but also in humans. WNV is currently endemic on all continents; its distribution area is expanding in Europe and for the last twenty years, it is considered as a re-emerging virus. In horses, although vaccines are available, vaccination coverage is insufficient and no therapeutic treatment is available. In this context, the objective of this thesis was to identify antiviral molecules that could block WNV replication in the brain of horses.

In recent years, many studies have aimed at identifying antiviral molecules. But for many of them, cell models with little physiological relevance (e.g. human cell lines) have been used. The results obtained may therefore not be transposable to cells of the equine nervous system. Therefore, in order to be able to identify molecules with a stronger antiviral potential in the equine brain, our first objective was to develop a cellular model of WNV infection, based on equine neural cells derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs). With this new model, we were able to achieve our second objective: a phenotypic screen of a small library of 45 selected molecules. This screen revealed that molecules,

already known to block WNV replication in other models, behaved either in the same way in equine neural cells (case of 2'CMC), or on the contrary, had no antiviral activity in these cells (case of favipiravir and sofosbuvir) or, surprisingly, had an opposite role to the one expected (case of statins). These last results led us to initiate a research that aimed at understanding the mechanisms underlying opposite roles in cells of human or equine origin.

With the objective of being able to identify broad-spectrum antiviral molecules, we have also initiated a work with the Eastern Equine Encephalitis Virus (EEEV). This other zoonotic neurotropic arbovirus responsible for fatal encephalitis in humans and equids, belongs to the *Togaviridae* family, genus *Alphavirus*. It is present exclusively on the American continent at the moment. Our results showed that equin neural progenitor cells (eNPCs) are highly permissive to EEEV, providing a new model of infection that could be used in the future to test the antiviral potential of small molecules.

This work has therefore allowed 1/the establishment of two new models of infection by equine arboviruses, belonging to two different families (WNV and EEEV), 2/the development of automated microplate assays based on cell imaging and 3/to confirm or deny the antiviral role of selected molecules in equine brain cells. Our results also outlined the importance of using physiologically relevant in vitro models for evaluating the antiviral potential of molecules.

REMERCIEMENTS

Je remercie les Docteurs Fabienne ARCHER et Stéphane PRONOST d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'évaluer ces travaux.

Aux Docteurs Gaelle GONZALEZ et Stéphane BIACCHESI, merci d'avoir accepté d'être d'examineurs dans ce jury.

Professeur Nadia HADDAD, je vous remercie d'avoir participé au comité de thèse et pour votre implication dans cette aventure.

Docteur Muriel COULPIER, je vous remercie d'avoir encadré cette thèse, d'avoir accepté de vous lancer dans cette aventure, la dernière pour moi, dans l'équipe ZEN et dans l'UMR Virologie.

A la direction de l'UMR Virologie : Merci d'avoir validé cette aventure. Et au-delà, merci pour votre confiance.

Je remercie les Docteurs Anne DANCKAERT et Nathalie AULNER, responsables de la plateforme Imagerie à l'institut Pasteur pour leur implication dans ce travail en assurant les acquisitions des différentes plaques.

L'équipe ZEN-US : je vous remercie, pour votre implication dans ce travail : François, cher collègue, pour les aspects bioinformatiques : les tours de moulinettes pour récupérer les données d'imagerie, tes compétences en R pour générer les arbres phylogéniques et les statistiques, Kamila et Aïcha pour le renfort dans les quantifications des ARN par RT-qPCR et des particules virales par TCID50. Noémie et Valentine, merci pour avoir répondu toujours favorablement à mes demandes de hNPC pour les manips et pour tous ces échanges sur les schémas expérimentaux, mais pas que...

L'autre ZEN (la Référence) : Camille, Tehei, Marine, Souheyla, Nolwenn, merci pour votre soutien. Camille, merci pour les moments : décompression.

La Guadeloupe : Sylvie, Lise merci pour vos messages d'encouragement.

Mon petit, merci pour TOUT.

Virginie, Sandrine, Marion, Stacy : merci pour les relectures, les conseils précieux lors des répétitions. Sophie, merci pour la réservation des salles de présentation.

Aurore, Fleur, Mister YU : Je vous remercie pour votre soutien et vos encouragements.

L'UMR Viro : Merci à vous toutes et tous pour le soutien et merci de m'avoir déchargée des activités transversales pendant la rédaction du manuscrit.

La VIM : merci pour le soutien.

Mazigh, Alex, Sophie (la grande), Flo : Toujours présents ! Merci pour vos messages sympathiques.

Luis et Naïma, les amis, toujours aussi dynamiques ! merci pour votre présence.

Ma tribu : merci pour ton soutien.

Ma famille : le message était : « on ne lâche rien, on va jusqu'au bout ». Mission accomplie ! Merci pour ta présence.

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN : Acide RiboNucléique
ARNsb : ARN simple brin
ARNdb : ARN double brin
ATCC : American Type Culture Collection
ATPase : Adénosine TriPhosphate
AZT : azidothymidine

B

BCIP : 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
BoDV : Borna Disease virus
BPTI : Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
BSAA : Broad-Spectrum Antiviral Agent
NSB-3 : Niveau de sécurité biologique 3

C

CC50 : 50% cytotoxic concentration
CCL : chemokine ligand
CD : cellule dendritique
CCR : chemokine receptor
2CMC : 2'-C-Methylcytidine
CoV : Coronavirus
CsA : Cyclosporine A
CXCL10 : chemokine interferon- γ inducible protein 10 kDa
Cyp : Cyclophiline

D

DAA : Direct-Acting Antiviral
DC-SIGNR : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin receptor
DENV : Dengue Virus
DHODH : déhydrogénase dihydroorotate

E

EBOV : Ebola virus
EBV : Virus d'Epstein Barr
EC50 : Effective Concentration 50
eCDC : European Centre for Disease Control
ECP : Effet cytopathique
ECV304 : human endothelial cell line
ED : Cellules équines de derme (E. Derm)
EEEV : virus de l'encéphalite virale équine
eIF : Eukaryotic Initiation Factor
eiPSC : equin induced pluripotent stem cell

E

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

eNPC : Equin Neural Progenitor Cells

EPR : épithélium pigmentaire rétinien

EV : entérovirus

F

FBDD : Fragment-based drug design

FC : Facteur de croissance

FDA : Food and Drug Administration

H

HBCA : Humain Brain Cortical Astrocytes

25-HC : 25-hydroxycholesterol

HCV : Hepatitis C virus

HepG2 : Hepatocarcinoma cell line 2

HIV-1 : Human immunodeficiency virus 1

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A

hNPC : Human Neural Progenitor Cells

HS : heparan sulphate

Hsps : (Heat shock proteins) 70 and 90

HSV-1 : Herpès Simplex Virus de type 1

HTA : Host-Targeting Agent

HVE : HerpèsVirus Equin

I

IC50 : Inhibitory Concentration 50

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

IFCE : Institut Français du Cheval et de l'équitation

IFN : Interféron

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL-1 β : Interleukine 1 β

IL-6 : Interleukine 6

IMP α : importing alpha protein

IMPDH (inosine-5'-monophosphate) dehydrogenase

iNOS : Inducible Nitric Oxide Synthase

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

iPSC : induced pluripotent stem cell

IRF : Interferon Response Factor

ISG : Interferon Stimulated Gene

ISRE : Interferon Stimulated Response Element

J

JEV : Japanese encephalitis virus

K

kb : Kilobase

kDa : Kilo Dalton

K

KO : Knock-Out

KUNV : Kunjin virus

L

LASV : Lassa virus

LCR : liquide céphalorachidien

LDL : low-density lipoprotein

LDLr : low-density lipoprotein receptor

LIV : virus de Louping Ill

M

MERS : Middle-East Respiratory Syndrome

MIF : Macrophage Inhibition Factor

MMP9 : Matrix MetalloPeptidase 9

MOI : Multiplicity of Infection

MVEV : Murray Valley encephalitis virus

N

NDGA : Nordihydroguaiaretic acid

NK : Natural Killer

NNIs : Non-Nucléosides Inhibiteurs

NNRTIs : Non Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors

NTPase : Nucleotide Phosphatase

NS : Non-structural

NY-99 : New York 1999 (souche WNV)

O

OAS : 2'5'-Oligoadénylate Synthétase

OMSA : Organisation Mondiale de la Santé Animale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFU : Plaque Forming Unit

pH : Potentiel Hydrogène

PI : Post-Infection

PPIase : Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase

PRNT90 : réduction des plages de lyse 90%

PRR : Pattern Recognition Receptor

PV : Poliovirus

Q

qPCR : quantitative PCR

R

RBD : Receptor Binding Domain

RC : Replication Complex

RE : Réticulum Endoplasmique

RESPE : Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Equine

R

RFC : Réaction de Fixation du complément
RK13 : Lignée de cellules épithéliales de rein de lapin
RMN : résonnance magnétique nucléaire
RTPase : ARN Triphosphatase
RVFV : Rift Valley Fever Virus

S

SARS : Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV 2 : Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2
SH-SY5Y : human neuroblastoma cell line
SIGNR : Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin receptor
siRNA : small-interfering Ribonucleic Acid
SLEV : Saint Louis Encephalitis Virus
SMCypI : Small-Molecule Cyclophilin Inhibitor
SNC : Système Nerveux Central
SREBP : Sterol regulatory element-binding proteins
SVF : Sérum de Veau Foetal

T

TAM : Tyro3, Axl, Merck receptors
TBEV : Tick borne encephalitis virus
TCID50 : Tissue Culture Infective Dose 50%
TIM : T-cell Immunoglobulin Mucin domain
TLR : Toll-Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TRAIL : Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand

U

USUV : Usutu virus
UTR : Untranslated Region

V

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule
VERO : green monkey epithelial kidney cell line
VEEV : Virus de l'encéphalite équine de l'Est
VHB : Virus de l'Hépatite B
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VZV : Virus varicelle-zona

W

WEEV : Virus de l'encéphalite équine de l'Ouest
WNV : West-Nile Virus
WT : Wild-Type

Y

YFV : Yellow Fever Virus

Z

ZIKV : Zika Virus

FIGURES

Figure 1 : Aire de circulation des principaux virus responsables d'encéphalites équine	19
Figure 2 : Signes cliniques associés à une infection par le virus West-Nile	21
Figure 3 : Arbre phylogénique des <i>Flaviviridae</i>	26
Figure 4 : Arbre phylogénique de virus West-Nile	28
Figure 5 : Modélisation structurale de l'organisation de la protéine E à la surface des virions	28
Figure 6 : Génome du WNV	29
Figure 7 : Les protéines E des Flavivirus	30
Figure 8A et 8B : Représentation en coupe, d'une particule du WNV	31
Figure 9 : Complexe réplicatif des <i>Flavivirus</i>	32
Figure 10 : Cycle de réplication du WNV	36
Figure 11 : Cycle de transmission enzootique du virus West-Nile	37
Figure 12 : Nombre de cas équin aux USA de 1999 à 2022	39
Figure 13 : Etapes de la dissémination du virus WN chez les vertébrés	43
Figure 14 : Nombre de drogues approuvées par la FDA entre 1963 et 2016	52
Figure 15 : Cibles envisageables pour les différents antiviraux DAA et DHA	60
Figure 16 : Schéma de la voie de synthèse de l'acide mévalonique ou mevalonate pathway (MVP) Localisation des inhibiteurs	65
Figure 17 : One step growth cycle	71
Figure 18 : Schéma expérimental du TOA (48h)	72
Figure 19 : Schéma expérimental du TOA (20h)	73
Figure 20 : Atorvastatine (ATO) et Fluvastatine (FLU) exercent un effet proviral dans les eNPC après la phase d'adsorption du virus	93
Figure 21 : Etapes du cycle viral du WNV en cellules de mammifère	94
Figure 22 : Caractérisation du cycle de réplication du virus West Nile dans les eNPC	95
Figure 23 : Quantification par imagerie cellulaire automatisée du TOA sur eNPC	96
Figure 24 : Schéma expérimental : Inhibition de la synthèse du Cholestérol par AY-9944	97
Figure 25 : AY-9944 inhibe la réplication de WNV dans les eNPC	98
Figure 26 : Atorvastatine (ATO) et Fluvastatine (FLU) exercent un effet antiviral dans les hNPC après la phase d'adsorption du virus	99
Figure 27 : Quantification par imagerie cellulaire automatisée du TOA sur hNPC	
Figure 28 : AY-9944 est sans effet sur la réplication de WNV dans les hNPC	102
Figure 29 : EEEV a un effet cytopathique sur les eNPC	103
Figure 30 : Les eNPC sont permissives à EEEV	104
Figure 31 : L'effet cytopathique de EEEV sur les eNPC	104
Figure 32 : Action des inhibiteurs sur la voie de synthèse de l'acide mévalonique	113

TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux virus responsables des encéphalites virales équine	16
Tableau 2 : <i>Alphavirus</i> responsables d'encéphalites équine	18
Tableau 3 : Récapitulatif des fonctions des protéines virales lors du cycle viral	34
Tableau 4 : Les antiviraux à action directes (DAA) contre WNV et d'autres <i>Flavivirus</i>	54
Tableau 5 : Les antiviraux ciblant l'hôte (HTA) contre WNV et d'autres <i>Flavivirus</i>	59
Tableau 6 : Structure des Statines	64

Table des matières

Remerciements	5
Liste des abréviations	6
Liste des figures	10
Liste des tableaux	11
I Introduction	16
<u>1. Les encéphalites virales équine</u>	16
1.1. Les virus	16
1.2. Leur répartition géographique	18
1.2.1. Les encéphalites virales équine à <i>Alphavirus</i>	18
1.2.2. Les encéphalites virales équine à <i>Flavivirus</i>	19
1.2.2.1. Emergence et ré-émergence	19
1.2.2.2. Les causes de l'expansion géographique	19
1.2.2.3. Les risques	20
1.3. La clinique	20
1.4. La prévention et les traitements	22
1.4.1. Le diagnostic	22
1.4.2. La surveillance, les mesures préventives	22
1.4.3. Les vaccins	23
1.4.4. Les traitements	24
1.5. Le contexte actuel	24
<u>2. Le virus West Nile (WNV)</u>	25
2.1. La classification	25
2.2. La structure du WNV	28
2.2.1. L'organisation génomique	29
2.2.2. Les protéines structurales	30
2.2.3. Les protéines non structurales	31
2.3. Le cycle viral	34
2.4. Le cycle de transmission	37
2.5. L'épidémiologie	37
2.6. La pathogenèse	40
2.6.1. L'infection périphérique	40
2.6.2. L'infection du système nerveux central	40
2.6.2.1. L'entrée dans le SNC	40
2.6.2.2. L'infection dans le parenchyme cérébral	43
2.6.3. Les réponses cellulaires à l'infection	44
<u>3. Les modèles d'étude</u>	46
3.1. Les modèles cellulaires et les modèles <i>in vivo</i>	46

3.2. Les cellules souches pluripotentes induites	47
3.2.1. L'historique	47
3.2.2. Les principaux facteurs de reprogrammation	47
3.2.3. Les vecteurs	48
3.2.4. Le choix des cellules	48
3.2.5. La différenciation	48
3.3. Le potentiel des iPSC	49
3.4. Les avantages de ce modèle 2D pour notre étude	50
 <u>4. Les molécules antivirales</u>	 51
4.1. Les généralités	51
4.1.1. L'historique	51
4.1.2. La classification	52
4.1.3. Les antiviraux à large spectre	52
4.1.4. Les antiviraux contre les arbovirus neurotropes	53
4.2. Les Antiviraux à action directe (DAA)	53
4.2.1. Les DAA et les <i>Flavivirus</i>	54
4.2.2. Les DAA visant la polymérase virale	56
4.2.3. Les DAA visant d'autres protéines virales	57
4.2.4. Les DAA à large spectre	57
4.3. Les antiviraux ciblant l'hôte (HTA)	58
4.3.1. Les HTA et les <i>Flavivirus</i>	59
4.3.2. La description des quelques HTA	61
 II- Les objectifs de ce travail de thèse	 66
 III- Matériel et méthodes	 67
<u>1. Les cellules</u>	67
1.1. Les cellules neurales progénitrices humaines (hNPC)	67
1.2. Les cellules neurales progénitrices équine (eNPC) dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC)	67
1.3. Les lignées cellulaires commerciales	67
1.3.1. Les lignées épithéliales Vero et A549	67
1.3.2. Les conditions générales	68
 <u>2. Les virus</u>	 68
2.1 Le virus West Nile (WNV)	68
2.2. Le virus de l'encéphalite virale équine (EEEV)	68
2.3. L'amplification du WNV	68
2.4. Les titrations du virus West Nile	68
2.4.1. Par la méthode des plages de lyse	69
2.4.2. Par TCID50 (50% Tissue Culture Infectious Dose)	69

2.5. La cinétique d'infection des eNPC par le virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV)	69
<u>3. Les molécules utilisées</u>	70
3.1. Les molécules antivirales et la banque « MolPort »	70
3.2. L'inhibiteur de la voie de synthèse de l'acide mévalonique	70
<u>4. Criblage de molécules antivirales</u>	70
<u>5. Calcul de CC50, IC50 et IS</u>	70
<u>6. Expérience de cycle unique de réplication (One step growth cycle)</u>	71
<u>7. Expérience d'ajout d'une molécule à différents temps (Time of drug addition assay (TOA))</u>	72
7.1. TOA (48h)	72
7.2. TOA (20h)	73
<u>8. Inhibition de la voie de synthèse de l'acide mévalonique</u>	74
<u>9. Analyse par microscopie</u>	74
9.1. Immunomarquage indirect	74
9.2. Analyse en imagerie cellulaire automatisée	74
<u>10. Biologie moléculaire</u>	75
10.1. Extraction des ARN viraux	75
10.2. Reverse Transcriptase RT	75
10.3. qPCR	75
<u>11. Statistiques</u>	75

IV- Résultats 76

<u>1. Développement d'un crible phénotypique basé sur l'utilisation de cellules progénitrices neurales équines et identification de molécules pro- et anti-virales contre le virus West Nile</u>	76
--	----

Article :

A novel equine iPSC-based phenotypic screening platform identifies pro- and anti-viral molecules against West Nile virus 76

<u>2. les statines : des molécules provirales dans les cellules progénitrices neurales équine et antivirales dans les cellules neurales progénitrices humaines. Caractérisation de leur mode d'action</u>	91
2.1. Mécanisme d'action des statines dans les eNPC infectées par WNV	92
2.1.1. Etape(s) du cycle viral ciblée(s) par les statines	92
2.1.2. L'effet proviral des statines est-il médié par une inhibition de la synthèse du cholestérol ?	96
2.2. Mécanisme d'action des statines dans les hNPCs infectées par WNV	98
2.2.1. Etape(s) du cycle viral ciblée(s) par les statines dans les hNPC	98
2.2.2. L'effet antiviral des statines est-il médié par une inhibition de synthèse du cholestérol ?	101
2.3. Conclusion	102
<u>3. Infection des eNPC par le virus de l'encéphalite équine de l'est (EEEV)</u>	103
 V- Discussion Générale	 106
 VI- Valorisation du travail de thèse	 116
 VII- Bibliographie	 117

I- Introduction

Les affections neurologiques d'origine infectieuse, toxique ou parasitaire restent rares chez les équidés. Le syndrome nerveux chez le cheval correspond à un ensemble de symptômes liés à un dysfonctionnement du système nerveux central, périphérique ou neuromusculaire visible par une modification du comportement, de la posture, de l'allure, l'apparition de mouvements anormaux et une perte musculaire importante. Les affections du système nerveux constituent la quatrième cause de mortalité chez le cheval [1]. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux encéphalites d'origine virale.

1. Les encéphalites virales équine

Les encéphalites virales équine sont une préoccupation pour la filière équine. Etant la cinquième cause de mortalité chez les chevaux [2] elles représentent une menace sanitaire et économique importante pour l'industrie équine mondiale. Ces pathologies neurologiques vont avoir des répercussions importantes à plus ou moins long terme (supérieur à 6 mois) sur les performances athlétiques des chevaux. Elles peuvent entraîner des séquelles graves voir conduire à la mort de l'animal. La prise en charge des équidés représente un coût conséquent pour le propriétaire.

1.1. Les virus

Les virus responsables des encéphalites virales équine appartiennent essentiellement à 5 familles virales [2] listées dans le tableau 1 ci-dessous :

Famille	Genre	Virus (exemples)	Vecteur		Génome	
<i>Herpesviridae</i>	<i>Varicellovirus</i>	EHV-1 et 4			ADN db	120-240 kb
<i>Bornaviridae</i>	<i>Mammalian 1 orthobornavirus</i>	BoDV*			ARN+ sb	8,9 kb
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	RABV*			ARN- sb	11 kb
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	WEEV*, EEEV*, VEEV*	Moustique	genre <i>Culex</i>	ARN+ sb	11-12 kb
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	WNV*, JEV*, SLEV*, MVEV*	Moustique	genre <i>Culex</i>	ARN+ sb	9-12 kb
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	TBEV*, LIV	Tique	genre <i>Ixodes</i>	ARN+ sb	9-12 kb
* Zoonoses						
Très rares						

Tableau 1 : **Principaux virus responsables des encéphalites virales équine.**

EHV-1 : alphaherpesvirus équin 1 ; BoDV : virus de la maladie de borna ; WNV : Virus West Nile ; TBEV : Virus de l'encéphalite à tique ; LIV: virus de Louping ill ; JEV : virus de l'encéphalite japonaise ; SLEV : virus de l'encéphalite de Saint-Louis ; MVEV ; Virus de l'encéphalite de la vallée de Murray ; EEEV : virus de l'encéphalite équine de l'Est ; VEEV: Virus de l'encéphalite équine du Vénézuéla ; WEEV : virus de l'encéphalite équine de l'Ouest ; sb : simple brin ; db : double brin ; kb : kilo base. (Adapté de Lecollinet et *al.* 2019) [2].

Il est important de différencier les encéphalites virales équine en fonction du mode de transmission de l'agent pathogène considéré. Trois agents pathogènes sont transmis par contact direct entre chevaux, par les sécrétions ou les excréments. Il s'agit des virus de la rage, de la maladie de Borna et de l'herpesvirus équin qui appartiennent aux trois premières familles (Tableau 1). Pour ces virus et/ou ces pathologies, le constat suivant peut être fait : les virus peuvent être soit, ¹/relativement bien maîtrisés dans les pays industrialisés ou ²/ils peuvent être géographiquement contraints et/ou ³/les mesures de prophylaxie employées peuvent être efficaces. Ainsi, la maladie de Borna est très rare et localisée en Europe centrale. Dans le cas de la rage, le vaccin a permis d'éradiquer la maladie en France et elle reste rare en Europe occidentale [1]. L'herpesvirus équin, communément appelé rhinopneumonie équine reste une préoccupation pour la filière équine. Il a un impact économique important malgré une prophylaxie efficace.

Nous avons choisi de nous concentrer sur les virus équins transmis par les arthropodes et responsables de nos jours de la majorité des encéphalites virales équine. Ils présentent un risque majeur lié à des spécificités que nous présenterons.

La majorité des encéphalites virales équine sont des arboviroses zoonotiques dues à des arbovirus transmis par des insectes hématophages (moustiques principalement et tiques) qui sont dits « vecteurs ».

Le nom arbovirus correspond à l'abréviation de « *arthropod-borne virus* » (virus transmis par des arthropodes). Les arbovirus (plus de 500 virus) sont majoritairement des virus à ARN appartenant principalement à 5 familles virales :

- *Reoviridae*, (genre : *Orbivirus*, *Coltivirus* et *Seadornavirus*)
- *Flaviviridae* (genre : *Flavivirus*)
- *Togaviridae* (genre : *Alphavirus*)
- *Bunyaviridae* (genres : *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, et *Tospovirus*)
- *Rhaboviridae* (genre : *Vesiculovirus*).

Les moustiques transmettent environ 265 arbovirus différents dont moins de 150 sont pathogènes pour l'Homme et l'animal et une dizaine est pathogène pour le cheval [3].

Les arbovirus peuvent provoquer une hyperthermie, des encéphalites, des fièvres hémorragiques. Les arbovirus qui provoquent des encéphalites virales chez le cheval appartiennent principalement à 2 familles virales :

- *Flaviviridae* : (genre : *Flavivirus*) : le virus de l'encéphalite Japonaise (JEV), le virus West-Nile (WNV), le virus de l'encéphalite de Saint-Louis (SLEV), le virus de l'encéphalite de la vallée de Murray (MVEV) et le virus de l'encéphalite à tique (TBEV).
- *Togaviridae* : (genre : *Alphavirus*) les virus des encéphalites équine de l'est, de l'ouest et du Venezuela (EEEV, WEEV et VEEV), le virus de la rivière Ross (RRV) et le virus Getah (GETV).

Les *Alphavirus* V/E/WEEV et le *Flavivirus* JEV sont responsables d'encéphalites équine d'origine exotique pour nous, européens. L'Europe est indemne de ces infections. Le tableau 2 présente leurs caractéristiques principales.

Si, nous nous positionnons sur des critères de nombre, de répartition mondiale et de fréquence, les encéphalites virales équine transmises par les arthropodes sont principalement dues au virus West-Nile.

1.2. Leur répartition géographique

Les virus des encéphalites équine exotiques et les *Flavivirus* WNV et JEV voient leur aire de distribution s'étendre ces dernières décennies.

1.2.1. Les encéphalites virales équine à *Alphavirus*

Le tableau 2 résume les principales informations sur les encéphalites équine exotiques (EEEV, VEEV, WEEV) et la répartition des virus. Ils sont localisés exclusivement sur le continent américain. Ces trois virus ont une zone de circulation qui leur est spécifique (figure 1). La tendance actuelle serait sur une extension de ces zones de circulation.

Genre	Virus	Découverte		Aire de circulation	vecteurs	Réservoir	Mortalité en pourcentage		Vaccin	
Alphavirus	VEEV*	1936	Vénézuéla	Amérique du Nord, Amérique du Sud	genre <i>Culex</i>	rongeurs	75		1961 Vaccin vivant atténué TC-83 (formalin) ; 1974 Vaccin inactivé C-83 (formalin)	VEEV strains Trinidad donkey/TC-83
	EEEV*	1933	New Jersey	Amérique du Nord, Amérique du Sud	genre <i>Culiseta</i> <i>Culex</i>	passeriformes	80-90	Dead-end-host		
	WEEV*	1930	Californie	Amérique de l'Ouest	genre <i>Culex</i>		50			

Tableau 2 : ***Alphavirus* responsables d'encéphalites équine**, découverte, aire de circulation, vecteurs, réservoir et % de mortalité après infection. *zoonoses (Adapté de Azar et al. 2020 ; Stromberg et al. 2020). [4] [5]

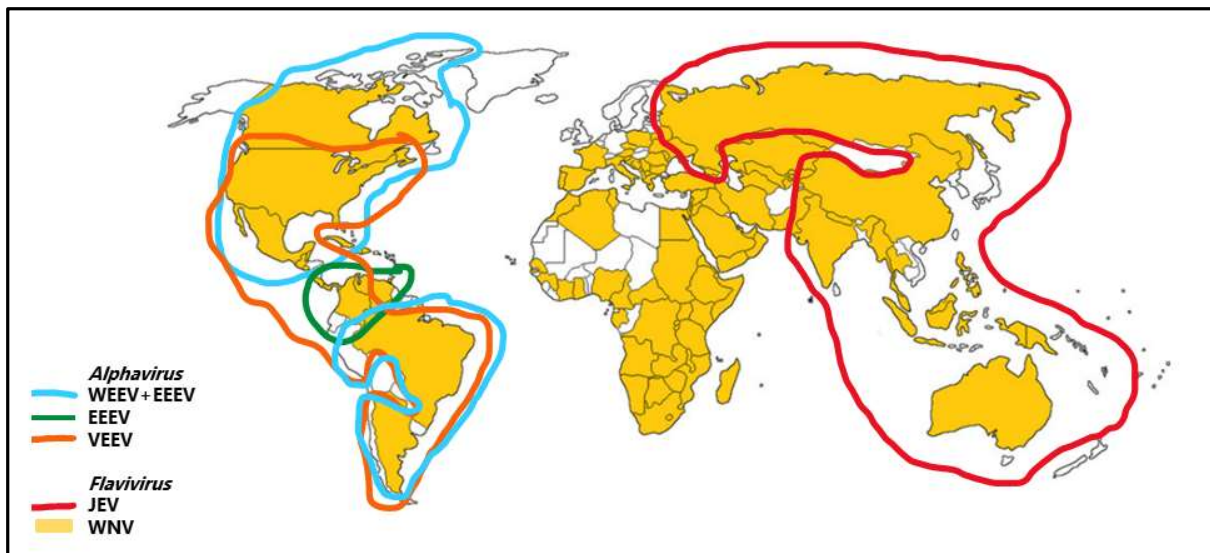


Figure 1 : **Aire de circulation** des principaux virus responsables d'encéphalites équine. Adapté de Lecollinet *et al.* 2019 et Chapman *et al.* 2018. [2] [3]

1.2.2. Les encéphalites virales équine à *Flavivirus*

Les *Flavivirus* ont une répartition variable comme le montre la figure 1. Le virus de l'encéphalite japonaise est présent en Asie, en Océanie et en Russie orientale. Le virus de la vallée de Murray circule dans une zone très limitée : l'Océanie. Ces virus occasionnent des épidémies sporadiques et peu à peu, leur zone de circulation s'étend. Le virus West-Nile a une répartition mondiale. Il est maintenant endémique dans de nombreux pays. Initialement à l'origine d'épidémies sporadiques, il est depuis plus de dix ans, à l'origine d'épidémies récurrentes.

1.2.2.1. Emergence ou ré-émergence

Ces virus circulent depuis plusieurs décennies et étaient responsables d'épizooties sporadiques plus ou moins graves. L'émergence ou la ré-émergence de ces virus reste imprévisible avec des phases silencieuses plus ou moins longues. La dénomination d'émergence s'applique à l'apparition de ces virus dans une zone jusque-là indemne.

Depuis une vingtaine d'année, le phénomène d'émergence et de ré-émergence s'est accentué avec des épidémies WNV récurrentes de grande ampleur enregistrées en Europe.

1.2.2.2. Les causes de l'expansion géographique

Elles sont multiples et principalement liées au mode de vie de l'Homme, à son action sur son environnement et au mode de transmission des arbovirus.

Les hôtes vertébrés et non-vertébrés (réservoirs et vecteurs) connaissent une dispersion géographique importante en raison des changements environnementaux majeurs auxquels nous faisons face (climat, biodiversité, etc.) et de l'intensification des échanges internationaux. Pour exemple, le moustique tigre est apparu en France en

2004 et connaît depuis une expansion sur le territoire. Les estimations prédisent que pour 2050, la moitié de la population mondiale vivra dans des environnements tropicaux, ce qui peut favoriser également la ré-émergence de ces virus [6].

L'urbanisation, l'augmentation de la densité de population entraînent un déplacement sur des zones [6] « sauvages » qui étaient auparavant le sanctuaire des arthropodes. Cela modifie les écosystèmes. Il y a une transition d'écosystème sauvage à un écosystème urbanisé. L'Homme s'expose et expose également les animaux domestiques, à de nouveaux arthropodes [6].

1.2.2.3. Les risques

L'émergence des virus des encéphalites équine exotiques en Europe constitue un risque majeur préoccupant en santé humaine et animale. Pour exemple, JEV circule depuis 2000 en Russie orientale. Ces virus pourraient être à l'origine de graves épidémies, chez le cheval et chez l'Homme. En effet, ces pathogènes étant absents, les systèmes immunitaires sont naïfs. Dans le cas des virus des encéphalites équine exotiques, le risque est plus grand. VEEV est facilement transmissible par les aérosols et l'Homme et le cheval infectés peuvent transmettre le virus, alors que pour la majorité des autres arbovirus neurotropes, ils sont dits « cul de sac épidémiologique ». Ces virus semblent également s'adapter facilement à un nouveau vecteur et plusieurs genres de moustiques sont décrits comme vecteurs potentiels [4].

Les génomes à ARN de ces virus sont sujets aux mutations ce qui favorisent l'apparition de nouvelles souches. Il n'y a pas de système de correction des erreurs. WNV est un bon exemple, les suivis montrent souvent une corrélation entre nouvelle épidémie et apparition ou introduction d'une nouvelle souche.

Les moustiques sont difficiles à maîtriser. L'analyse de suivi de la circulation des moustiques sur le territoire français et ailleurs dans le monde le montre. Les zones d'extension/distribution de ces vecteurs du virus West-Nile et d'autres arbovirus neurotropes sont difficilement prévisibles. La France était colonisée quasi-entièrement par le genre *Culex*. En 2004, le moustique tigre *Aedes albopictus* est introduit en Alpes-Maritimes, depuis 67 départements sur 96 sont colonisés. Les mesures préventives et curatives pour limiter leur nombre ne suffisent pas pour contenir les populations de moustiques.

1.3. La clinique

Les encéphalites virales équine ont un tableau clinique assez proche. Elles induisent généralement une encéphalite ou une myélo-encéphalite. Il s'agit d'une inflammation du système nerveux central (cortex, tronc cérébral et cervelet) et/ou de la moelle épinière. Les animaux infectés peuvent manifester des changements comportementaux, des déficits d'équilibre, de posture et de démarche.

L'appréciation des signes cliniques par les vétérinaires spécialisés en clinique équine reste un exercice ardu. Les examens neurologiques accompagnés des différents

tests de réflexes, postures et mouvements, sont essentiels pour évaluer la progression de la maladie, poser un pronostic et proposer des options thérapeutiques.

Ainsi, la figure 2 présente le tableau clinique dans le cas d'une infection par le virus West-Nile. Chez le cheval, la phase d'incubation est de 2 à 15 jours. Bien qu'une majorité de chevaux développent une forme asymptomatique de la maladie (70-80 % des cas), 20 à 30 % développeront un état fébrile voire une forme neuro-invasive pour 1 à 10 % des cas. L'issue sera alors, dans 20 à 57 % des cas, la mort de l'animal, ou une convalescence longue, pouvant présenter des séquelles neurologiques graves.

Les chevaux sont considérés comme « sentinelles » de l'infection et permettraient de détecter une circulation précoce du virus avant l'apparition des premiers cas humains d'infection.

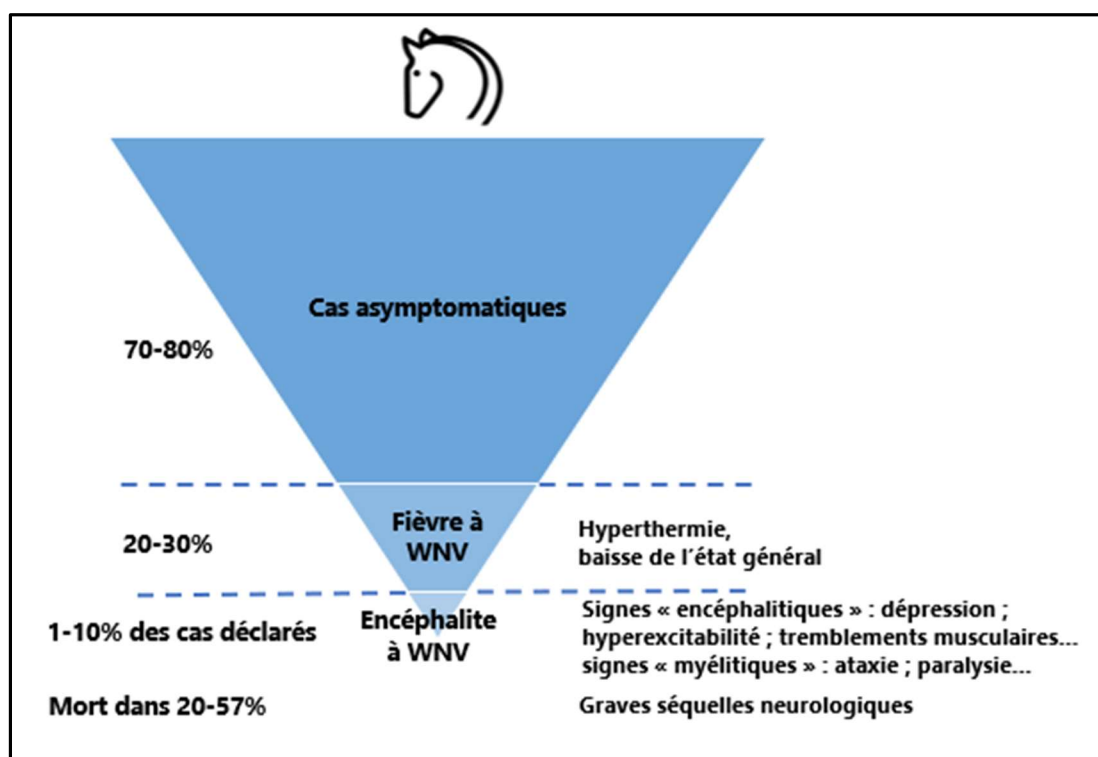


Figure 2 : **Signes cliniques** associés à une infection par le virus West-Nile

Chez l'homme, la phase d'incubation peut durer jusqu'à 14 jours. Comme pour le cheval, les formes asymptomatiques et bénignes représentent respectivement 80 et 20 % des cas. En revanche, les formes neuroinvasives représentent moins de 1% des cas et touchent principalement les personnes âgées avec un taux de mortalité faible (< 10 %).

Dans ce contexte, quels sont les outils de prévention et de diagnostic à disposition ?

1.4. La prévention et les traitements

1.4.1. Le diagnostic

Les signes cliniques et les symptômes sont multiples mais souvent communs aux différentes encéphalites virales équine. Il est donc difficile pour le vétérinaire de poser un diagnostic définitif, à la suite de l'examen clinique de l'animal. Seul, le diagnostic différentiel de laboratoire permet de définir l'étiologie de la maladie. Les méthodes utilisées sont divisées en deux groupes :

- > les tests virologiques : ils consistent en la détection de l'ARN viral dans le sang, le liquide céphalorachidien (LCR), l'urine ou les organes d'un individu, par RT-qPCR. Les techniques moléculaires de diagnostic sont de plus en plus performantes et spécifiques.

- > les tests sérologiques : il s'agit des Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), de la séroneutralisation par réduction des plages de lyse 90 % (PRNT90), des immunomarquages fluorescents, de tests d'inhibition d'hémagglutination et des immuno-essais sur microsphères (MIA).

1.4.2. La surveillance, les mesures préventives

La maladie induite par WNV est une maladie réglementée pour laquelle les cas équins d'infection sont notifiés à la commission européenne depuis 2009. Chaque état membre déploie un système de surveillance épidémiologique intégrant les événements collectés dans les 4 compartiments (santé humaine, équine, aviaire et entomologique) de la chaîne de transmission du WNV [7]. En France, le volet équin de surveillance est assuré majoritairement par le réseau d'épidémio-surveillance en pathologie équine (RESPE), les vétérinaires indépendants et les propriétaires sensibilisés à une éventuelle circulation du virus dans une zone géographique considérée (pourtour méditerranéen). En Europe, l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) centralise les cas rapportés par les états membres tous les ans, pour les différents hôtes via le système ADIS (Animal Disease Information System).

Aux USA, le Center for Disease Control and prevention (CDC) assure via ArboNet (National Arbovirus surveillance System), une surveillance par un recueil des données sur la circulation du WNV.

La prophylaxie est actuellement le meilleur moyen de lutte contre les infections WNV. Elle comprend :

- > des mesures sont prises pour limiter le déplacement des moustiques. Ainsi, depuis quelques années, les vols de passagers entre certaines zones géographiques font l'objet d'un traitement par aérosol en cabine avant le départ. Les déplacements de chevaux, à partir de zones à risques sont également réglementés. Les oiseaux migrateurs potentiellement réservoirs du WNV font l'objet d'une surveillance pour tracer les couloirs migratoires.

>une lutte anti-vectorielle qui consiste à limiter les eaux stagnantes et à démoustiquer les zones sensibles afin d'éliminer à la fois les moustiques adultes et les larves.

>des campagnes de sensibilisation pour promouvoir une protection individuelle anti-moustique : se prémunir des piqûres de moustiques, intégrer des bonnes pratiques pour limiter l'implantation et la prolifération des moustiques dans son environnement. La filière équine reçoit également des consignes pour limiter l'exposition des chevaux aux moustiques.

>La vaccination des chevaux est un moyen de prévention efficace mais elle est non obligatoire. Aussi, compte-tenu de son coût, elle n'est pas systématique même dans la zone de circulation des virus.

1.4.3. Les vaccins

Des vaccins dirigés contre des arbovirus responsables d'encéphalites virales sont disponibles. Ainsi, un vaccin anti JEV est disponible pour le cheval et l'Homme. Aux USA, deux vaccins anti VEEV sont proposés pour les chevaux et les personnes exposées (Tableau 1). En revanche, il n'y a pas de vaccin contre WEEV et EEEV. Des recherches sont en cours pour pallier ce manque.

En ce qui concerne le virus West Nile, trois vaccins disposent d'une autorisation de mise sur le marché européen (AMM) et sont disponibles uniquement pour les équidés.

>Un vaccin basé sur la souche WNV-VM2 inactivée avec adjuvant (EQUIP WNV®, auparavant Duvaxyn WNV®, Fort Dodge Animal Health/Pfizer).

- Schéma : 2 injections à 3-5 semaines d'intervalle sur chevaux d'âge > 6 mois ; Rappel annuel ; Autorisation : 11/2008.

>Un vaccin recombinant ou vaccin chimérique avec adjuvant, basé sur un virus canarypox exprimant les protéines de surface prM et E du WNV (PROTEQ WEST NILE® en Europe, Recombitek West Nile® aux USA, Merial/ Boehringer Ingelheim).

- Schéma : 2 injections à 4-6 semaines d'intervalle sur chevaux d'âge > 5 mois ; Rappel annuel ; Autorisation : 08/2011.

>Un autre vaccin recombinant basé sur une chimère du virus de la fièvre jaune souche vaccinale 17D exprimant les protéines prM et E du WNV (PreveNile® Intervet/MSD Animal Health) a été utilisé puis retiré du marché en raison de problèmes à la suite de cette vaccination [8]. Ce vaccin chimérique a été remplacé par une forme inactivée.

- Schéma : 2 injections à 3-5 semaines d'intervalle sur chevaux d'âge > 6 mois ; Rappel annuel ; Autorisation : 06/2013.

>Un vaccin à ADN contenant des adjuvants, le West Nile-Innovator DNA® (Fort Dodge Animal Health/Pfizer, Zoetis) est uniquement disponible aux USA.

Contrairement aux USA, où le virus circule sur tout le territoire, les vaccins sont peu utilisés en Europe, en effet, les épizooties (localisation ampleur) de WNV y sont

difficilement prédictibles et la mise en place d'une immunité protectrice est longue (supérieure à 6 semaines).

Aucun vaccin n'est actuellement disponible en santé humaine. Compte tenu de la ré-émergence du virus West-Nile et du risque zoonotique qu'il représente, les recherches de nouveaux vaccins sont en cours. Trois vaccins, destinés à l'homme et aux chevaux sont actuellement en essais cliniques de phase III [9].

Si la vaccination n'est pas pour le moment la meilleure option en prévention contre les encéphalites virales équine, quelles sont alors les approches thérapeutiques envisageables ?

1.4.4. Les traitements

Actuellement, il n'y a pas de traitement efficace et spécifique pour traiter les différentes encéphalites virales équine. L'approche vise à traiter les symptômes, uniquement.

En cas de troubles neurologiques, les chevaux sont isolés, dans un local calme et semi-éclairé pour éviter qu'ils ne se blessent. Un traitement symptomatique est alors administré. Il consiste en une fluidothérapie associée à des anti-inflammatoires, des vitamines (vit.C et vit.B1) associés à des tranquillisants afin d'atténuer les symptômes.

Nous ne disposons pas actuellement de molécules antivirales spécifiques et efficaces permettant de traiter l'infection par WNV. Plusieurs essais ont été entrepris, avec de la ribavirine, mais son effet reste mitigé [10]. D'autres molécules ont été évaluées telles que l'acide mycophénolique ou l'interféron alpha sans résultat concluant [11].

1.5. Le contexte actuel

Actuellement en Europe deux virus zoonotiques, responsables d'encéphalites sont soumis à la loi de santé animale entrée en vigueur le 21 avril 2021. Il s'agit du virus de la rage qui a été éradiqué sur une majorité du territoire depuis 2001, excepté en Europe de l'Est : Pologne (Rapport de l'eCDC-2021 : The European Union One Health 2021 Zoonoses Report). La rage est une maladie soumise à une surveillance obligatoire devant être contrôlée par tous les Etats membres, soumise à éradication obligatoire et à restriction de mouvements entre Etats membres. Le virus West-Nile, virus continuellement ré-émergeant en Europe est le second. Les cas d'infection équine, humains et aviaires recensés par chacun des états membres sont notifiés à la commission européenne via le système ADIS (Animal Disease Information System). Le virus West-Nile est endémique dans de nombreux pays. Il a connu ces dernières années une extension de sa distribution géographique en atteignant l'Europe du Nord avec des premiers cas aviaires et équine mis en évidence en Allemagne en 2018 [12] et au Pays-Bas en 2020 [13]. Il reste à l'origine d'épidémies récurrentes, dont l'intensité est

imprévisible. Certaines souches de virus West-Nile sont virulentes et ont une pathogénicité plus ou moins élevée chez l'hôte humain et/ou équin et/ou aviaire.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au WNV, un virus zoonotique d'intérêt en santé publique et vétérinaire pour lequel il est difficile d'anticiper la réémergence et pour lequel il n'existe pas de traitement efficace chez l'homme et le cheval. Il est donc essentiel de concentrer les efforts sur le développement de moyens de lutte et de traitements antiviraux efficaces.

2. Le Virus West-Nile (WNV)

Le virus West-Nile a été isolé en 1937, dans le district de West-Nile en Ouganda [14] dans le sang d'une femme présentant un état fébrile.

2.1. La classification

La famille *Flaviviridae* comprend 4 genres : *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* et *Pegivirus* (Figure 3). Ce sont des virus à ARN simple brin (9-13kb), de polarité positive, enveloppés et à capsid icosaédrique. Les particules virales ont une taille de 40 à 60 nm de diamètre.

Le genre *Flavivirus* comprend plus de 70 virus qui sont majoritairement des Arbovirus transmis par les moustiques et les tiques. Le nom *Flavivirus* a une origine latine du nom *flavus*, "yellow" jaune. Elle vient historiquement de la mise en évidence par Walter Reed du premier virus transmissible à l'homme ayant pour vecteur le moustique : le virus de la fièvre jaune (YFV).

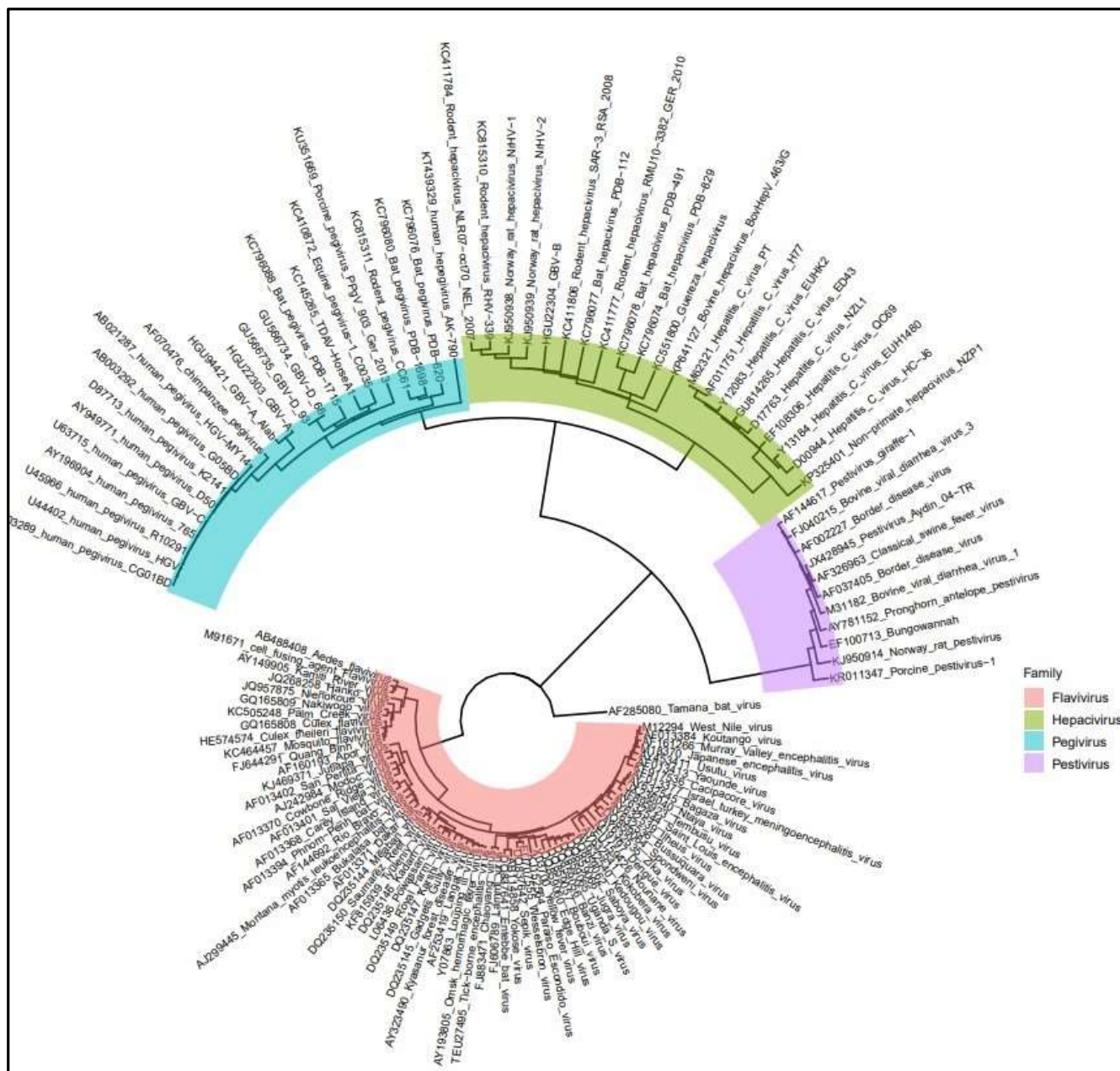


Figure 3 : **Arbre phylogénique des Flaviviridae** (François PIUMI 2022-UMR Viro) (GGTREE version 3.6.2 package R)
Source des données : <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/resources>

Le virus West-Nile est subdivisé en 9 lignées en fonction de sa biologie, son évolution, sa localisation géographique et de sa pathogénicité [9]. L'arbre phylogénétique (Figure 4) réalisé à partir des données extraites de la revue de Rizzoli *et al.* 2015 [15] présente ces 9 lignées.

Les lignées 1 et 2 sont les plus répandues, les plus virulentes et responsables, chez l'Homme et le cheval d'épidémies parfois sévères avec des formes neuroinvasives.

> La **lignée 1** se découpe en 3 « clades » : la clade 1a qui inclut des isolats d'Europe, d'Afrique, des USA et du Moyen Orient, la clade 1b qui correspond à la

souche endémique : KUNJIN (Australie) et la clade 1c, récemment reclassifiée en **lignée 5** avec des souches spécifiques à l'Inde.

> La **lignée 2** a longtemps été restreinte à l'Afrique sub-saharienne et considérée comme moins pathogène. En 2004, la lignée 2 a émergé en Russie et en Hongrie avec l'apparition de souches neurotropes pathogènes pour l'Homme et le cheval. Elle a progressivement gagné l'Europe de l'Ouest dont la France en 2018. [16]–[20].

> Les **lignées 3 et 4** regroupent des isolats d'Europe centrale. WNV Rabensburg isolé de moustiques *Culex pipiens* et *Aedes rossicus* en République Tchèque en 1997 constitue la seule souche de WNV lignée 3. La lignée 4 est localisée en Espagne et en Autriche.

> La **lignée 6** comprend une seule souche de WNV, très proche des souches de lignée 4. Elle diverge par une séquence de la NS5. Elle est localisée en Espagne.

> La **lignée 7** est présente au Sénégal et en Somalie. Elle est très neurovirulente pour les souris [21]. Au Sénégal, il y a très peu d'infections symptomatiques à WNV. Cependant 80% de la population, ainsi que les chevaux et les oiseaux présentent des anticorps. La **lignée 8** est également présente au Sénégal.

> La **lignée 9** serait proposée pour une souche isolée en Autriche [22].

Actuellement, les épidémies avec des formes neuroinvasives en Europe sont principalement dues à des souches de WNV de lignée 2, issues d'une souche neurovirulente identifiée en Afrique [18], [23].

En dehors des lignées 1 et 2, l'aire de distribution des autres lignées reste localisée géographiquement. Il ne faut cependant pas écarter une possible adaptation à de nouveaux vecteurs ou une adaptation de ces autres lignées à un nouvel environnement.

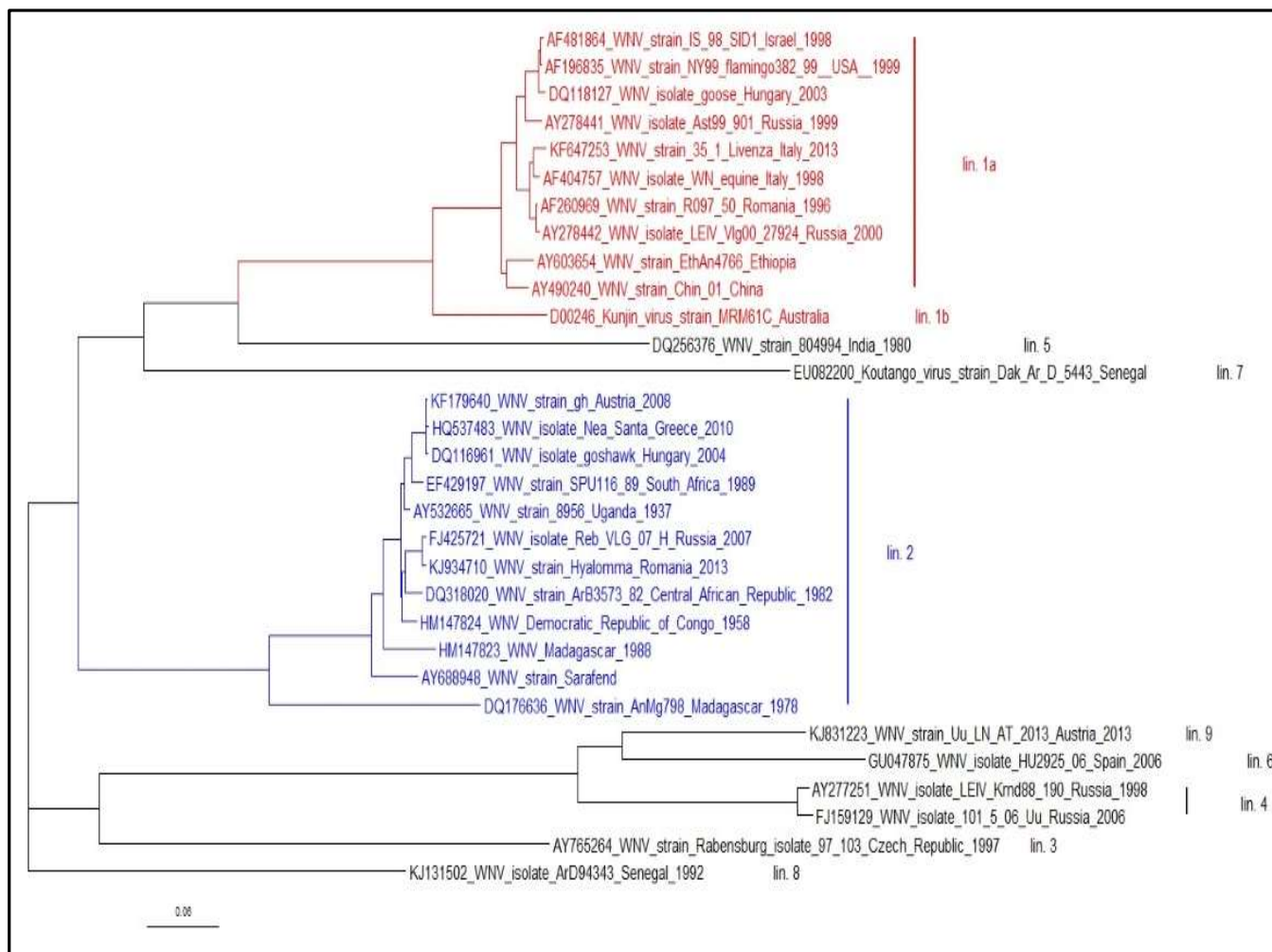
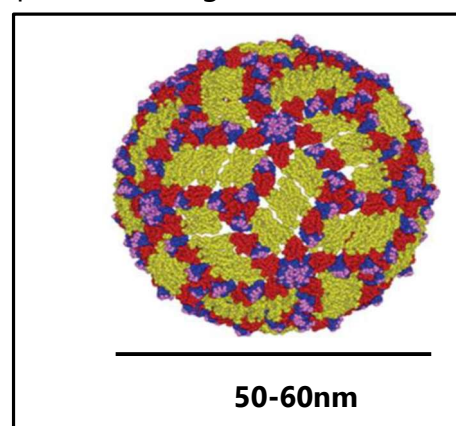


Figure 4 : **Arbre phylogénique de virus West-Nile** (François PIUMI 2022-UMR) (GGTREE version 3.6.2 package R)
Source des données : <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2015.20.20.21135>

2.2. La structure du WNV

La particule virale mature du virus West-Nile mesure environ 50 nm (Figure 5). Sa capside icosaédrique est entourée d'une enveloppe composée essentiellement d'une bicouche lipidique et expose à sa surface, la glycoprotéine E (Figure 7, 8A et 8B).

Figure 5 : **Modélisation structurale de l'organisation de la protéine E à la surface des virions.** Une particule de *Flavivirus* mature contient 90 dimères de protéines E organisés avec une symétrie icosaédrique T=3. **Domaine DI = rouge**, **domaine DII = jaune**, **domaine DIII = bleu**. Les principaux épitopes du domaine DIII inducteurs d'anticorps neutralisant sont représentés en violet. D'après (Diamond *et al.*, 2008). [25]



2.2.1. L'Organisation génomique

Le virus West Nile possède un génome à ARN de polarité positive de 11kb, codant pour une polyprotéine. L'ARN viral est traduit en une polyprotéine qui est clivée pendant et après la traduction par des protéases virales et cellulaires en 3 protéines de structure (C, prM/M et E) et 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (Figure 6). Les clivages C/prM, prM/E, E/NS1, NS4A/NS4B [26], [27] et NS1/NS2A sont réalisés par des protéases cellulaires.

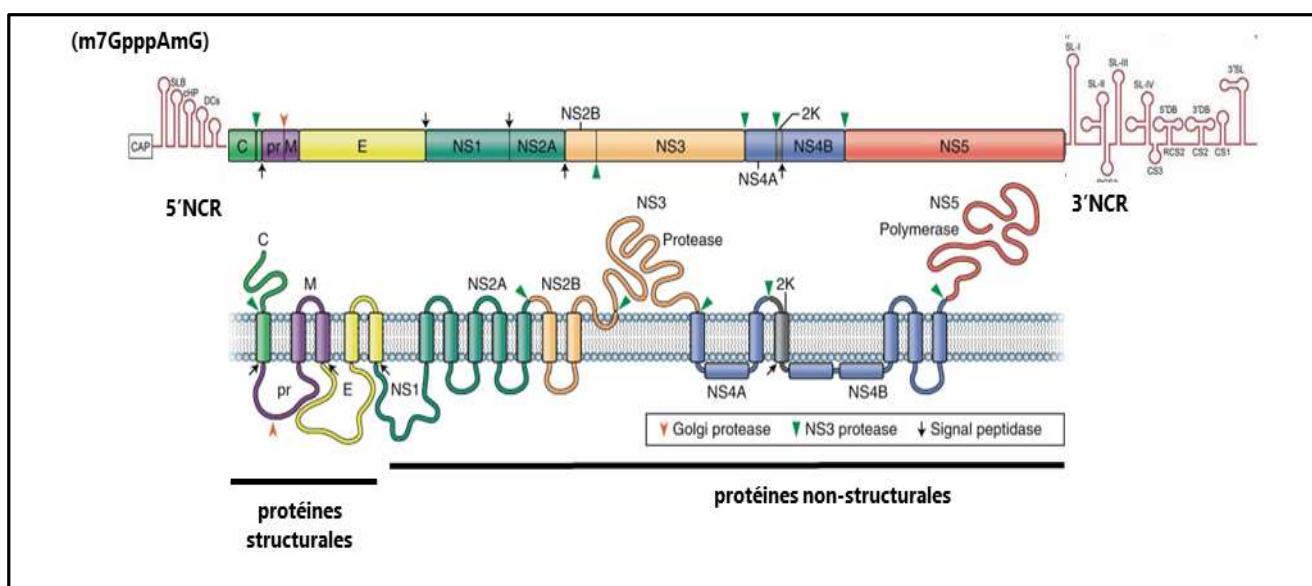


Figure 6 : **Génome du WNV.** Adaptée (Pierson *et al.* 2020) [24] ; Polyprotéine traduite au niveau du RE, les sites de clivage sont indiqués par des flèches : rouge : protéase cellulaire, vert : NS3 protéase, noir : peptide signal. Adapté de Pierson *et al.* 2020.

Son génome est flanqué de 2 extrémités non codantes ou NCR (Non Coding Region) conservées : une coiffe (7mGpppAmG) à son extrémité 5' et une extrémité 3' non polyadénylée. Ces structures secondaires en épingle à cheveux sont indispensables (Figure 6) pour les étapes de la réplication, la transcription, la traduction et l'empaquetage de l'ARN viral.

Les extrémités 5' et 3' du génome viral interagissent pour prendre une forme circulaire, essentielle pour la réplication [28], [29].

La région 5' : Non Coding Region (NCR) de 96 nucléotides protège l'ARNm viral de la dégradation par des ARN exonucléases cellulaires. Cette coiffe sert d'ancrage pour initier la traduction de l'ARN viral [30], [31].

L'extrémité 3' (NCR) de 632 nucléotides est caractérisée par une structure en épingle à cheveux. Elle est hautement conservée chez les *Flavivirus*. Elle sert de promoteur à la synthèse du brin ARN(+) [32]–[34].

2.2.2. Les protéines structurales

Les protéines structurales sont nécessaires pour l'encapsidation du génome viral par la protéine C, mais aussi pour les interactions et la fusion avec la cellule cible (protéines E et M) [35]–[37]. Les protéines de surface sont immunogènes et peuvent donc stimuler la réponse immunitaire de la cellule-hôte.

La protéine C ou Core

Cette protéine de 11kDa entre dans la composition de la capside virale. Elle joue un rôle important dans la réplication et dans l'encapsidation. Elle abrite le matériel génétique pour former ainsi la nucléocapside.

La protéine E

La glycoprotéine E d'enveloppe de 50-55kDa joue un rôle important dans l'assemblage de la particule. La glycoprotéine E protège les autres composants du virus et maintient l'intégrité de l'enveloppe. Elle est fortement impliquée dans la reconnaissance et la fixation aux récepteurs ainsi que dans la fusion à la membrane plasmique dans l'endosome [38]–[40].

La glycoprotéine E est très conservée chez les *Flavivirus*. Elle est constituée d'une partie soluble (sE : forme soluble de E) composée de 3 domaines structuraux indépendants : E-DI, E-DII et E-DIII, séparés par des boucles flexibles. Cette structure forme l'ectodomaine ou E-DI est le domaine central qui sert de connexion entre DII et DIII. E-DI assure également via des "tiges d'ancrage" (ou "stem-anchor") (Figure 7), la liaison à la membrane virale. Les glycoprotéines E sont organisées sous forme d'homodimères antiparallèle à la surface des virions matures.

Le E-DII est impliqué dans la formation et la stabilisation du dimère. De plus, il contient le peptide de fusion hydrophobe, impliqué dans la fusion membranaire entre le virus et l'endosome de la cellule hôte [39], [41].

Le E-DIII forme, quant à lui, une structure compacte en feuillets β présentant un repliement similaire aux immunoglobulines. Il contient les motifs de fixation aux récepteurs cellulaires [39], [41]–[43].

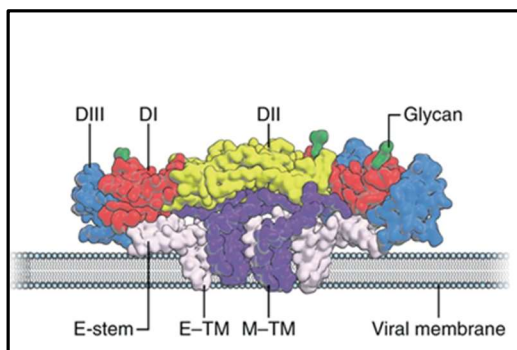


Figure 7 : Les protéines E des *Flavivirus* sont des structures allongées à trois domaines, attachées à la membrane virale par une tige et deux domaines transmembranaires antiparallèles. Les domaines de la protéine E sont indiqués en rouge, jaune et bleu (DI-III, respectivement). La protéine M, également attachée à la membrane virale par deux domaines transmembranaires, est représentée en violet. (Pierson *et al.* 2020) stem = stem-anchor [24]

La glycoprotéine M

La protéine M et son précurseur de 26kDa, prM sont respectivement ancrés dans la membrane virale de la particule mature et immatures. Ces deux formes sont essentiellement impliquées dans le changement et le maintien de la conformation de la protéine d'enveloppe E. La forme prM, en interagissant avec la protéine E, participe au repliement correct de celle-ci [44], [45]. La principale fonction de prM est de prévenir le réarrangement pH-dépendant de la protéine E. Ainsi, le peptide de fusion porté par E reste camouflé, lors du transport des particules immatures. Un clivage furine-dépendant de prM en deux fragments, pr et M, dans le réseau trans-Golgi, induit la conversion des particules immatures en particules matures infectieuses [41], [46]. A la suite du clivage, les hétérodimères prM-E se dissocient. Le fragment pr est relargué et des homodimères de protéines E se forment. La surface du virion prend une apparence « lisse » et les peptides de fusion sont exposés (Figure 8A et 8B).

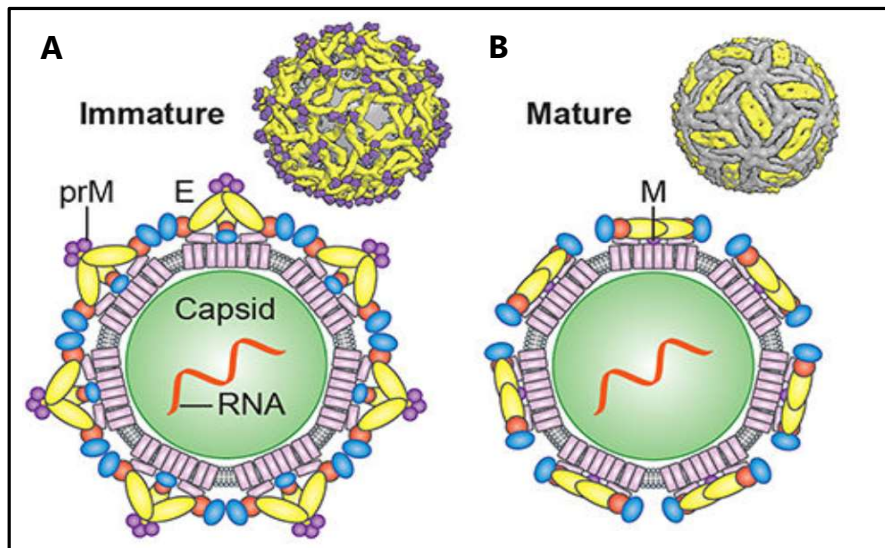


Figure 8A et 8B : **Représentation en coupe, d'une particule du WNV immature et mature.** D'après (Pierson *et al.* 2020) [24]

2.2.3. Les protéines non structurales

Les protéines non structurales sont absentes du virion mature. Elles sont impliquées dans la réplication virale, l'assemblage des particules et l'évasion à la réponse antivirale de l'hôte [37], [47].

La NS1

NS1 est une glycoprotéine de 46-55kDa. Elle existe sous 3 formes conformationnelles associées chacune à une localisation. Elle se présente sous forme d'un homodimère au niveau des membranes du réticulum endoplasmique (RE) (mNS1). Elle sert à recruter et à ancrer les facteurs cellulaires et viraux pour la réplication de l'ARN viral (Figure 9). Elle favorise l'attachement du virus au réticulum endoplasmique et assure la stabilité du virus dans la cellule hôte pendant sa maturation. La cellule sécrète une forme soluble hexamérique de NS1 ou sNS1, qui est retrouvée dans la

circulation sanguine des personnes infectées. Elle est détectée tôt, avant les premiers signes cliniques et permet de poser le diagnostic [9] . Cette forme va se fixer sur d'autres cellules, infectées ou pas. La forme extracellulaire est impliquée dans les mécanismes de régulation et d'évasion au système immunitaire inné par action sur le complément et sur TLR3 (Toll-Like-Receptor 3). Une forme NS1' secrétée, plus longue que la protéine NS1 de 52 acides aminés (52kDa) est mise en évidence, elle serait due à un clivage particulier sur un site alternatif dans NS2A. Cette forme serait impliquée dans la neurovirulence [48]–[50]. NS1 est absente du virion mature.

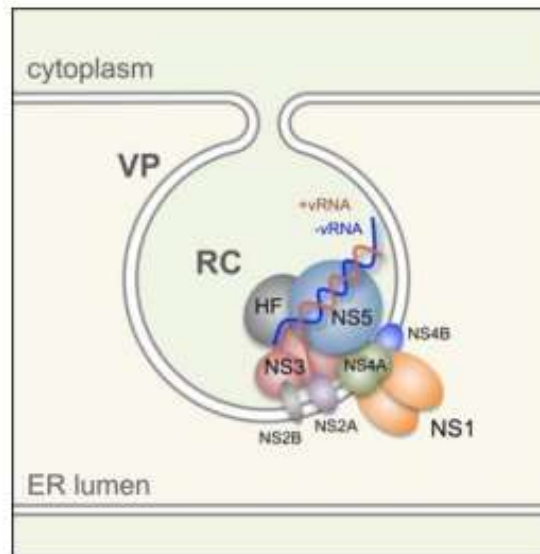


Figure 9 : **Complexe répliquatif des *Flavivirus*** (Muller et Young 2013) [51] HF : Facteur cellulaire

La NS2

NS2A est une protéine hydrophobe membranaire de 22kDa, impliquée dans l'assemblage des particules virales [52], [53]. Elle est aussi intégrée dans les complexes de réplication par interaction avec les protéines virales NS3 et NS5, ainsi qu'avec la région 3' NCR de l'ARN viral [54]. Cette localisation met en avant une participation de NS2A dans la coordination entre la réplication de l'ARN viral et son incorporation dans la nucléocapside [28] . Un rôle inhibiteur de la réponse interféron de type I de NS2A a été mis en évidence, ainsi qu'une implication dans l'apoptose induite au cours de l'infection virale [55], [56].

NS2B est une petite protéine de 14kDa associée aux membranes du RE, au niveau des complexes de réplication. Elle est impliquée dans le recrutement des autres protéines virales [57]. NS2B se lie à NS3 et permet son ancrage au RE. Elle agit alors comme un co-facteur de NS3 dans sa fonction protéasique. Le complexe NS2B/NS3 permet l'activation de la protéase virale NS3Pro [58], [59]. NS2 est très conservée chez les *Flavivirus*.

La NS3

NS3 est une protéine multifonctionnelle de 70kDa impliquée dans la réplication et le clivage de la polyprotéine. Au niveau de sa région N-terminale, NS3 porte un domaine d'activité sérine protéase NS3Pro. NS3Pro est responsable du clivage protéolytique des jonctions NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A et NS4B/NS5 [60]. Cette fonction de NS3 est également impliquée dans la maturation des protéines C et NS4A [61], [62]. En région C-terminale, on retrouve des domaines à activité enzymatique. Une ARN hélicase (NS3Hel), impliquée dans le déroulement de l'ARN viral, lors de sa réplication. Deux domaines impliqués dans le capping de l'ARN viral en 5' : une 5'ARN triphosphatase (NS3RTPase) qui permet la déphosphorylation de la partie 5' de l'ARN viral lors de la transcription, pour l'ajout de la coiffe [63] et une nucléoside triphosphatase (NS3NTPase) [64]–[66].

La NS3 du WNV contribue à l'induction d'une mort cellulaire par apoptose via l'activation de la caspase 8 [67]. Elle contribue aux effets cytopathiques produits au cours de l'infection par le virus. NS3 est une cible pour les antiviraux [68] compte tenu de son implication dans la pathogénèse et dans le cycle viral.

La NS4

NS4A et NS4B sont des petites protéines hydrophobes de 16 et 27 kDa, séparées par le peptide 2K. NS4A est localisée au sein des complexes de réplication [54], ce qui suggère un rôle dans la réplication de l'ARN. NS4A interagirait avec NS3 dans l'activité NS3NTPase. Une interaction NS1-NS4A est observée lors de la synthèse de l'ARN viral. Le clivage NS4A/2K/NS4B est nécessaire pour l'induction des réarrangements des membranes cytoplasmiques (formation de vésicules pour la réplication) par NS4A [69], [70]. Le peptide 2K sert de séquence signal pour la translocation de NS4B dans la lumière du RE [61]. Le clivage à la jonction 2K/NS4B est assuré par NS2B/NS3pro, en amont d'un peptide signal du domaine transmembranaire 2K [61]. Le rôle du peptide K2 est encore mal connu, il serait impliqué dans la synthèse de l'ARN viral ou dans un mécanisme d'évasion à la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, lors de l'étude de l'effet antiviral de la lycorine, un inhibiteur de la réplication de l'ARN des *Flavivirus*, une substitution sur un acide aminé de ce peptide induit une résistance à la lycorine [71]. NS4B fait également partie du complexe de réplication viral [72].

La NS5

NS5 est la plus grosse protéine du WNV d'un poids moléculaire de 103 kDa. C'est une protéine hautement conservée au sein du genre *Flavivirus* [73]. NS5 a deux domaines d'activités :

- Un domaine méthyltransférase (NS5MTase), en N-terminal avec une double activité méthyltransférase : (guanine-N7)-méthyltransférase (N7MTase) et (nucleoside-2'-O)-méthyltransférase (2'OMTase) qui est impliqué dans l'ajout de la coiffe en 5' de l'ARN viral [73]–[75].

- Un domaine ARN-dépendent ARN polymérase (NS5RdRp), en C-terminal qui assure la réplication du génome viral au sein d'un complexe réplicatif (Figure 9) [76]–[79].

NS5 participe à l'évasion à la réponse innée de l'hôte en empêchant l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT1 (pY-STAT1) et en réprimant l'expression des gènes sous contrôle des interférons de type I IFN- α et β [80], [81].

Protéines virale		Fonction	
		Cycle viral	Réponse immunitaire
	C	Encapsulation de l'ARN viral Uncoating	Activation de l'apoptose et mort cellulaire
	E	Attachement aux récepteurs cellulaires	
	prM/M	Assemblage des virions Protection des particules virales	Fusion virus/ cellules hôte Fusion membrane virale /cellules hôte
	NS1	Réplication de l'ARN viral Favorise l'attachement du virus sur le RE Stabilité du virus	Evasion immune - inhibition de l'activation du complément
NS2	A	Réplication de l'ARN viral Assemblage des virions	Evasion immune - perturbation de la transcription IFN
	B	Cofacteur de NS3 pour l'activité protéase Réplication du virus et assemblage	
	NS3	Sérine protéase extrémité Nterm NS3Pro ARN hélicase extrémité Cterm NS3Hel	
NS4	A	Réarrangement de la membrane virale	Inhibiteur de la réponse IFN- β et - α de l'hôte
	B	Réplication virale cofacteur de NS3 pour l'activité hélicase	Evasion immune (Inhibiteur de la réponse IFN- β et - α de l'hôte)
	NS5	Méthyltransférase NS5MTase ARN Polymérase ARN dépendante NS5RdRp	IFN- α et - β agoniste Evasion immune

Tableau 3 : **Récapitulatif des fonctions des protéines virales lors du cycle viral.**

2.3. Le cycle viral

Le cycle viral du virus West-Nile (Figure 10) débute comme celui des autres *Flavivirus* par une phase d'attachement de la protéine E sur un récepteur cellulaire. Plusieurs récepteurs sont suggérés : les heparan sulphate (HS), les Hsps (Heat shock proteins) 70 and 90, les CD14, CD4 [82], les DC-SIGN et DC-SIGNR, la protéine de liaison à la laminine, l'intégrine $\alpha\beta 3$, les TIM et les TAM. Après fusion, l'entrée de la particule se fait par internalisation avec recrutement de clathrine pour former l'endosome.

Dans le cytoplasme, une étape de fusion très rapide (1 à 15 min) [83] entre la membrane virale et la membrane de l'endosome s'opère. Ce mécanisme dépend du pH, l'acidification provoque un réarrangement et un changement de conformation des protéines E. Les peptides de fusion sont ainsi, exposés vers la membrane endosomale pour permettre la fusion avec l'enveloppe du virus. La nucléocapside, puis l'ARN viral sont libérés dans le cytoplasme. Très rapidement, l'ARN viral est désencapsidé et adressé au réticulum endoplasmique.

La réplication a lieu en deux temps au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique dans des vésicules (VP, vesicle packet) formées par l'invagination de la membrane du RE. Dans un premier temps, l'ARN viral sert d'ARNm pour la synthèse d'une polyprotéine. Cette polyprotéine est clivée par les protéases cellulaires et virales (NS3Pro). A partir d'un certain taux de protéines non structurales synthétisées [68], la deuxième étape peut commencer. L'ARN viral ARN(+) prend une forme circulaire à l'aide de ses extrémités non codantes 5' et 3' et la réplication par NS5RdRp de l'ARN(+) en un ARN(-) peut débuter. Celui-ci sert ensuite de matrice à la synthèse de l'ARN(+). Il s'agit des génomes des futures particules virales.

La formation des nouvelles particules peut ainsi débuter dans des vésicules. La nucléocapside va bourgeonner avec le RE pour acquérir la glycoprotéine d'enveloppe prM-E. La particule virale immature avec un aspect hérissé, va en passant dans l'appareil de Golgi devenir mature et prendre un aspect lisse. La maturation comporte 2 étapes : ¹/une baisse de pH induit un changement de conformation de prM-E puis ²/le clivage du PrM en M et pr sous l'action d'une furine cellulaire. La particule virale est alors libérée de la cellule par exocytose [38].

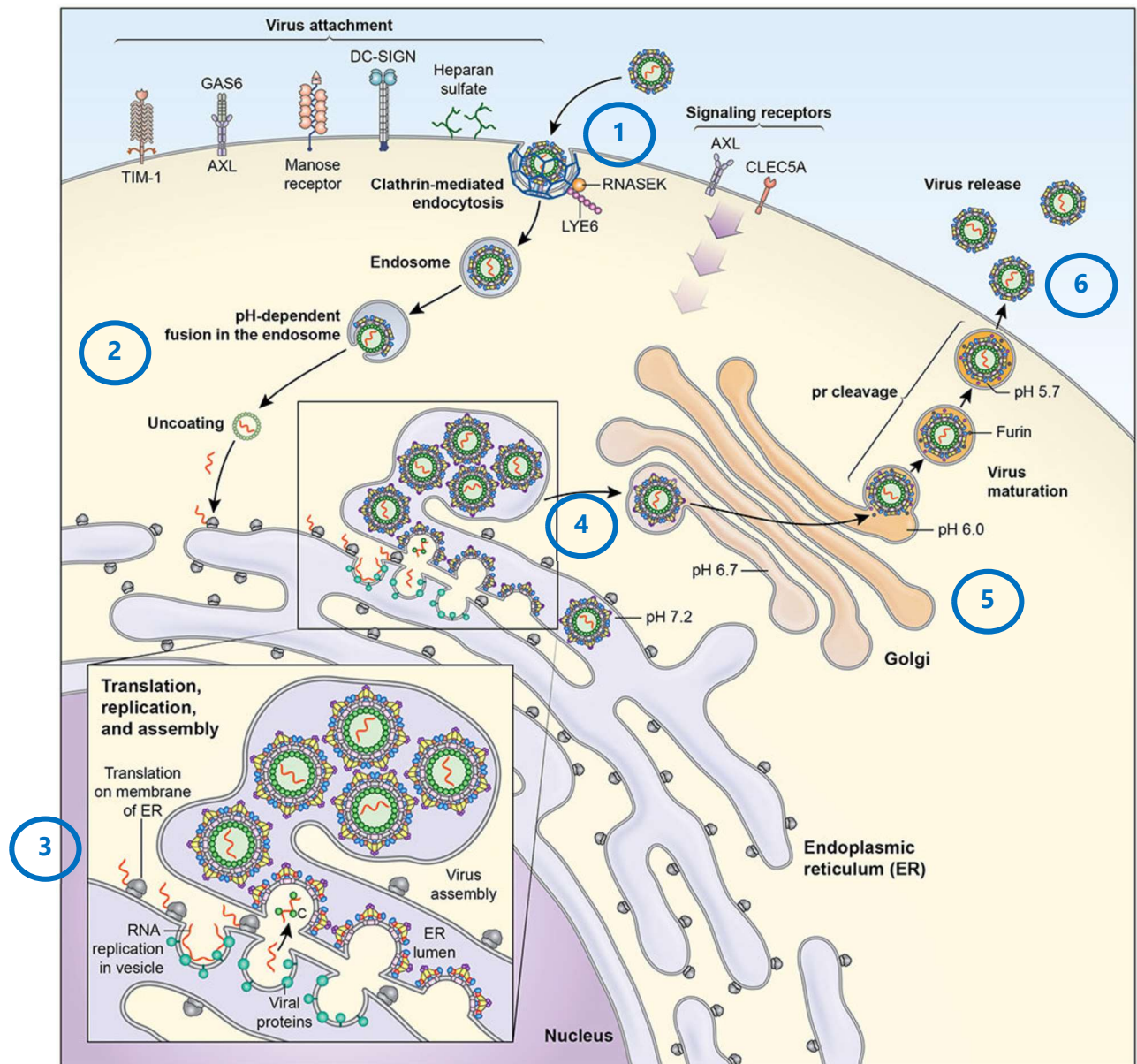


Figure 10 : **Cycle de réplication du WNV.** Adapté de Pierson *et al.* 2020 [24]

- | | |
|--|---------------|
| 1- Entrée | 5- Maturation |
| 2- Désencapsidation | 6- Libération |
| 3- Traduction, réplication, assemblage | |
| 4- Formation des virions | |

Le cholestérol joue également un rôle important dans le cycle viral du WNV et des autres *Flavivirus*. Il intervient aux différentes étapes du cycle viral de l'entrée du virus à sa libération [84]. Les lipides et principalement le cholestérol sont recrutés pour former des radeaux lipidiques pour exposer les récepteurs, au niveau du site d'attachement. Les complexes réplicatifs sont des microdomaines riches en cholestérol [85]. Les lipides et surtout le cholestérol sont des composants importants dans la membrane des nouveaux virions, ils sont d'origine cellulaire. Nous détaillerons ces points plus loin.

2.4. Le cycle de transmission

Le virus West-Nile est maintenu et amplifié dans un cycle de transmission enzootique de type : oiseau-moustique-oiseau (Figure 11). Les moustiques du genre *Culex* sont les principaux vecteurs [60]. Les mammifères (une trentaine d'espèces identifiées), qualifiés d'hôtes accidentels, peuvent également être infectés mais sont considérés comme cul-de-sac épidémiologiques. Seuls l'Homme et le cheval développeront des symptômes.

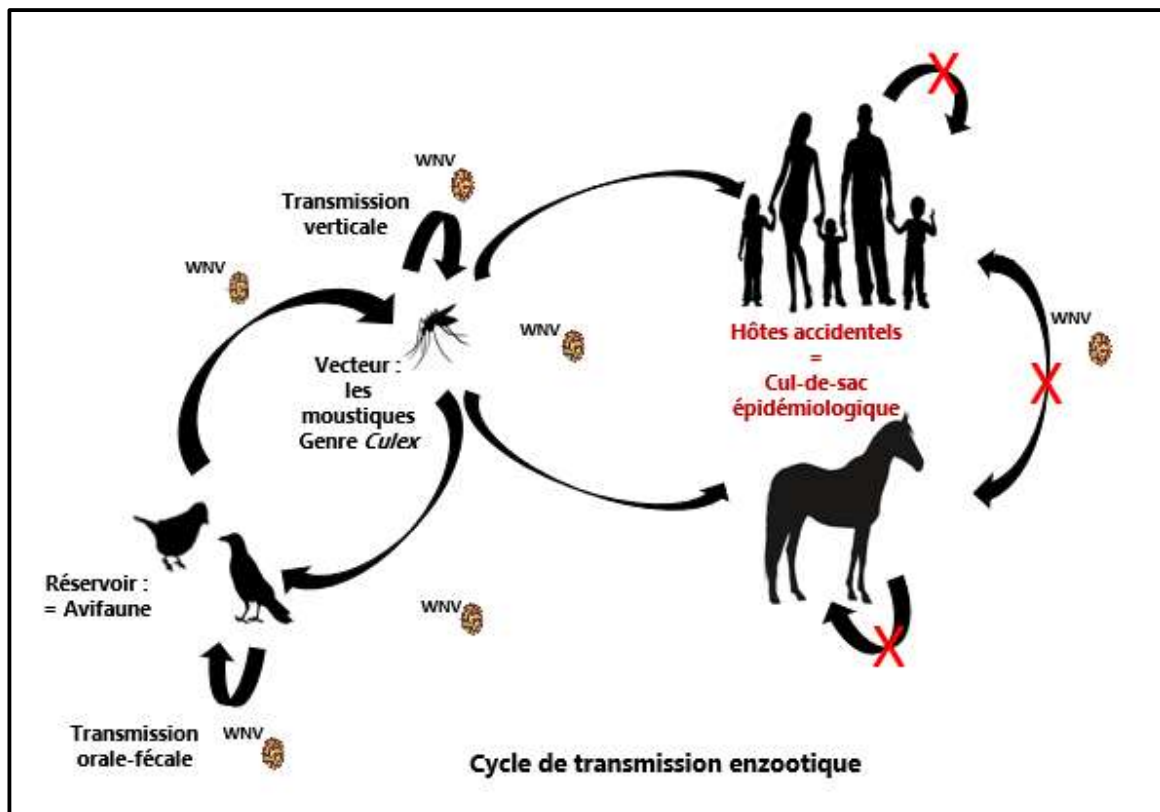


Figure 11 : **Cycle de transmission enzootique du virus West-Nile**

La période de transmission de WNV est dite « saisonnière » et correspond à la période d'activité des moustiques qui s'étend de juin à octobre. En dehors de la période d'activité du vecteur, les mécanismes de la persistance du virus restent mal connus.

Dans l'avifaune, plus de 326 espèces d'oiseaux sont décrites comme espèces réservoirs compétentes du virus [60]. WNV induit cependant majoritairement des infections subcliniques dans l'avifaune européenne, alors qu'un taux de mortalité élevé est constaté dans l'avifaune en Amérique du Nord. Les raisons de ces différences sont peu comprises.

2.5. L'épidémiologie

Le virus West-Nile a été découvert en 1937 en Ouganda. Il est resté longtemps très discret avec peu de foyers répertoriés. Les premières épidémies sporadiques et modérées dues au virus West-Nile débutèrent dans les années 1950 comme celles en

Egypte en 1950, en Israël en 1951, puis en Afrique dans les années 1970-1980. Le virus émergea en France, en 1962 le long du pourtour méditerranéen, en Camargue (départements 30, 34 et 83). L'infection fut diagnostiquée pour 80 chevaux atteints de troubles neurologiques avec un taux de mortalité élevé d'environ 30%.

Après 30 ans d'absence, le virus a ré-émergé en France en 2000, toujours en Camargue avec un foyer de 76 cas équins confirmés et une issue fatale pour 28% des cas. A partir du milieu des années 1990, le nombre d'épizooties recensées en Europe fut plus important, avec des infections plus sévères visibles en milieu urbain, dans des territoires où le virus circulait déjà tels qu'en Europe de l'Ouest, Europe de l'Est et en Afrique du Nord. Ainsi, en 1996, une épidémie au Maroc toucha 96 chevaux présentant tous des troubles neurologiques avec un taux de mortalité s'élevant à 44% ; et un cas humain d'infection avec une issue fatale [86]. En Israël en 1998 et 2000, des cas équins (18 cas) et humains (400 cas) d'infection neuroinvasive sont décrits [86], tout comme en Italie pour 14 équidés dont environ la moitié ont survécu.

A la même époque, en 1999, le virus West-Nile a émergé aux Etats-Unis, à New-York [87]. L'origine de son introduction reste encore inconnue [88]. L'épidémie se manifesta par de nombreux cas d'encéphalites dans l'avifaune, dans la population équine et chez l'Homme. L'analyse phylogénétique révéla une souche présentant 99.8% d'homologie avec la souche Israël 98 (lignée 1). En trois ans, le virus se propagea très rapidement sur l'ensemble du territoire. Le virus West-Nile est ainsi devenu endémique en moins de 10 ans dans ce pays.

La propagation sur l'ensemble du continent Américain fut également rapide avec une détection de celui-ci au Canada, au Mexique et dans les Caraïbes dans les années 2000 [89].

La dissémination de WNV lignée 1 en Amérique et son caractère neuropathogène pour l'avifaune et les équidés sont opposés à la pathobiologie des souches WNV lignée 1 circulant en Europe, peu neuroinvasives et rarement létales pour l'avifaune. Ainsi en 2020, un total de 52 532 cas humains d'infection WNV dont 25 849 formes neuroinvasives étaient déclarés aux USA (9% de mortalité). <https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/finalmapsdata/index.html>. Chez les équidés, la surveillance est assurée par l'Animal and Plant Health Inspection Service (département de l'agriculture). La figure 12 présente le nombre de cas équins notifiés de 1999 à 2022.

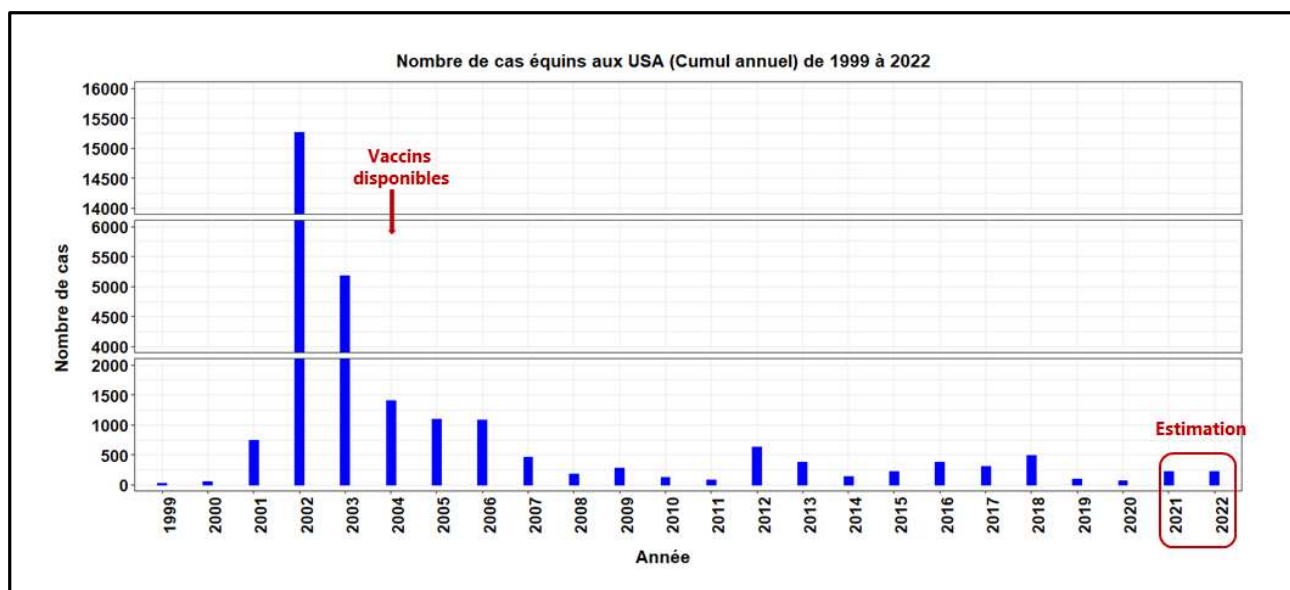


Figure 12 : Nombre de cas équins aux USA de 1999 à 2022

L'épidémiologie connue de WNV lignée 1 en Europe fut bouleversée à la suite de l'émergence de WNV lignée 2 en Hongrie en 2004. Cette nouvelle lignée se dissémina en Europe Centrale et de l'Est puis en Europe de l'Ouest, jusqu'à atteindre la France, l'Allemagne en 2018 et les Pays-Bas en 2020 [9], [37]. L'année 2018 fut en Europe, une année exceptionnelle de transmission de WNV. Un nombre de cas humains (N=2083) supérieur au nombre de cas comptabilisés en cumulant les données de 2010 à 2017 (N=1832) [90], [91] a été comptabilisé. Plusieurs hypothèses ont été émises : ^{1/}l'évolution des souches sous pression des facteurs environnementaux. Ainsi, le suivi sur plusieurs années montre que les rebonds des épidémies correspondraient à l'introduction d'une nouvelle souche et la diminution du nombre de cas reflèterait l'adaptation des souches à leur environnement. [91], ^{2/}une circulation accrue de moustiques, ^{3/}le déplacement des oiseaux et notamment pour certains, leur migration longues distances expliquant ainsi l'introduction de WNV en Europe depuis le berceau africain et la propagation sur le continent américain [92]–[94].

En 2022, l'Europe a de nouveau fait face à une saison de transmission intense de WNV notamment en Italie (586 cas humains déclarés sur un total de 965 pour l'ensemble des états membres). Ceci serait dû à la ré-émergence de WNV-lignée 1 après 8 ans d'absence [95], [96]. Dans la population équine, 94 foyers d'infection ont été déclarés dont 44 en Italie et 8 en France. A noter également, l'émergence du WNV dans le Sud-Ouest de la France en Gironde, une zone où le virus n'avait jamais été identifié.

L'épidémiologie du virus West-Nile en Europe est donc imprévisible et bouleverse nos connaissances sur la circulation établie du virus. Un moyen, pour la communauté scientifique, de se préparer à ces émergences ou ré-émergences est de connaître au mieux les déterminants moléculaires de virulence, la pathogénèse des

souches WNV chez ses différents hôtes afin de développer des traitements efficaces en ciblant le virus lui-même ou l'hôte infecté.

2.6. La pathogenèse

A la suite d'une piqûre de moustique infecté, une période d'incubation de 3 à 15 jours est observée selon les cas. Moins de 20% des infections s'expriment cliniquement, généralement sous la forme d'un simple syndrome pseudo-grippal (hyperthermie), plus rarement par une affection nerveuse du type méningo-encéphalite.

Nous nous intéressons dans cette partie à leurs mécanismes sans oublier que la maladie peut évoluer sous formes rénale, cardiaque, gastro-intestinale ou cutanée, plus d'autres occasionnelles que nous n'aborderons pas.

2.6.1. L'infection périphérique

Au site de la piqûre du moustique infecté, le virus cible les kératinocytes et les cellules dendritiques (DC), présentes dans la peau (cellules de Langherans). Transporté par les DC, le virus gagne, via la circulation lymphatique, les ganglions lymphatiques et les organes lymphoïdes périphériques tels que la rate [97]. Le virus va alors infecter les macrophages et les neutrophiles, ce qui conduirait à l'établissement d'une virémie. Le virus se réplique dans ces cellules et peut se propager à d'autres organes (rate, foie, rein...) par le sang et le système lymphatique [98]. C'est la première phase dite « précoce » de la maladie correspondant aux formes asymptomatiques et fébriles. Le virus va en parallèle, stimuler la réponse immunitaire innée, mais également parvenir à échapper au système immunitaire.

2.6.2. L'infection du système nerveux central

2.6.2.1. L'entrée dans le SNC

La neuropathogénicité du virus repose sur trois critères principaux. ^{1/} la capacité à générer une virémie suffisante et suffisamment longue [99], pour conduire à une neuroinvasion. ^{2/} La capacité de neuroinvasivité c'est-à-dire une prédisposition du virus à entrer dans le système nerveux central (SNC). Ce tropisme particulier serait associé à la protéine E d'enveloppe (domaine DIII) et notamment à une glycosylation en position 154-156 (NYS). ^{3/} la capacité de neurovirulence, c'est-à-dire la capacité à se répliquer et générer une progénie capable de se propager, d'infecter les cellules dans le SNC et induire une neuropathologie [100].

La neurovirulence n'est pas uniquement liée à cette glycosylation. Cela a été démontré en analysant les séquences des souches hautement et moins neuro-invasives de la lignée 1 [42], [101]. Certaines souches glycosylées (NYS) ne sont pas reconnues comme neuroinvasives sur souris lors d'études comparatives. Pour la lignée 2, si cette glycosylation est présente, elle n'est pas toujours associée à la capacité de neuroinvasion [23]. Pour les souches de lignée 2, la différence de neurovirulence serait

due à des mutations dans les protéines non structurales, impliquées dans les mécanismes de réplication et de clivage des protéines [21].

Le mécanisme d'entrée dans le SNC n'est pas clairement défini et plusieurs hypothèses sont avancées et présentées (Figure 13).

>1 Une première voie d'**entrée** pour le virus serait **par le système nerveux périphérique**. Le virus suivrait un transport axonal rétrograde ou antérograde depuis des nerfs périphériques infectés (nerfs moteurs ou sensitifs) remontant par la moelle épinière [102], [103]. Le virus infecterait les nerfs et se propagerait par transmission postsynaptique au nerf suivant. Ce mécanisme pourrait conduire à la nécrose des nerfs en cas de fortes infections. Une autre hypothèse avancée correspondrait au tropisme de WNV pour le nerf olfactif, il atteindrait ainsi le SNC par le bulbe olfactif.

>2 Une deuxième voie d'**entrée** serait **par la circulation sanguine**. Plusieurs options sont proposées et tiennent compte du fait que le virus est présent sous forme de particules libres ou dans des leucocytes infectés :

I- L'entrée en mode « cheval de Troie »

Elle s'applique aux particules virales internalisées dans les cellules infectées du système immunitaire : les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. En effet, ces cellules traversent naturellement la BHE. Les cellules endothéliales vasculaires cérébrales infectées expriment des molécules d'adhésion : vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) et E-Selectin connues pour favoriser le mécanisme d'entrée par infiltration des leucocytes. Les leucocytes infectés traverseraient ainsi la BHE et entreraient dans le SNC [104]. Cette voie serait plus une voie secondaire, consécutive à une infection systémique par le virus ou un autre pathogène.

II- Le virus entre à la suite de la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Le virus West-Nile induit une réponse inflammatoire des cellules endothéliales vasculaires cérébrales avec expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, TNF- α) et d'inhibiteurs de la migration des macrophages MIF [9]. Ces cytokines induisent la production de métalloproteinases (MMPs). Ces MMPs vont induire la perméabilisation de la BHE de façon transitoire ou non, facilitant alors l'entrée des leucocytes infectés.

En parallèle, les cellules endothéliales expriment des interférons de type I : IFN- α et β décrits pour avoir, un effet protecteur sur la BHE. Ils participent à maintenir son intégrité en préservant les jonctions serrées, pour limiter l'entrée du virus à la voie transcellulaire [105].

III- Les particules virales « traversent » la BHE

> soit elles infectent directement les cellules endothéliales pour atteindre le SNC. Le mécanisme d'attachement à la cellule endothéliale, son efficacité seraient dépendant de la glycosylation de la protéine E [37, 98, 104, 106, 107]. Des études sur modèles de cellules endothéliales microvasculaires du cerveau humain (HBMVE) suggèrent ce passage transcellulaire avec réplication du virus dans les cellules puis libération des virions néoformés dans le SNC. Les jonctions serrées ne seraient pas altérées et l'intégrité de la BHE ne serait pas perturbée [104], [108].

> soit elles traversent la cellule endothéliale par transcytose à l'intérieur de vésicules de clathrine ou de cavéoline [109].

Le timing entre infection du SNC et perméabilisation de la BHE n'est pas clair pour Kumar et al. 2010. Ils avancent que la perméabilisation serait une conséquence de l'entrée du virus et d'un début de neuroinvasion. Une autre étude suggère le même scénario [110]. Ainsi, la déstabilisation de la BHE serait une conséquence de l'infection du SNC. La destruction des jonctions serrées avec rupture de la BHE est associée à l'expression de MMP9 et d'autres MMP. Ce mécanisme contribue à favoriser l'entrée du virus dans le SNC. Il est suggéré que les astrocytes exprimeraient également MMP9 pour induire la perméabilisation de la barrière hématoencéphalique (BHE), en réponse au virus West-Nile même s'ils sont peu infectés par le WNV et uniquement par certaines souches [111].

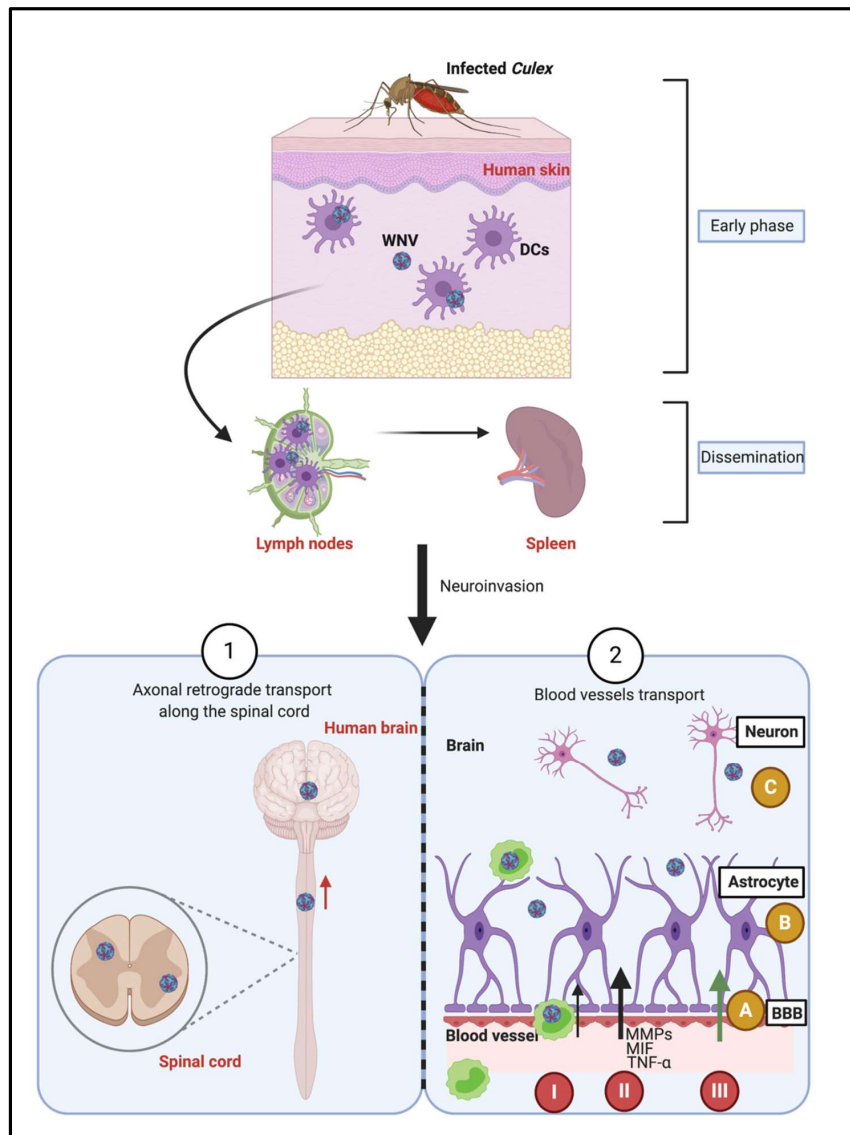


Figure 13 : **Etapes de la dissémination du virus West-Nile chez les vertébrés.** Phase précoce : infection des kératinocytes et des DC du derme. Dissémination pour multiplication dans les nœuds lymphatiques puis migration dans la rate. Deux voies d'entrées dans le SNC 1- Transport axonal rétrograde le long de la moelle épinière. 2- Transport par la circulation sanguine et trois mécanismes d'entrée possible : I- Mécanisme du « cheval de Troie » : le WNV est internalisé dans les lymphocytes qui peuvent franchir la BHE. II- Il y a perméabilisation de la BHE en réponse à la sécrétion de TNF- α et MIF. Après sécrétion de MIF par les leucocytes, les MMP sont produites en entraînant la perméabilisation de la BHE. III- Passage transcellulaire de WNV dû à un meilleur l'attachement de la protéine E (en rapport avec sa glycosylation). (Fiacre et al. 2020). [97]

2.6.2.2. L'infection dans le parenchyme cérébral

Dans le parenchyme, le tropisme du WNV est essentiellement les neurones. Le virus va se répliquer dans le cytoplasme et les virions formés vont se propager en infectant de façon trans-synaptique dans les neurones connectés. Le transport axonal rétrograde ou antérograde, des virions peut se faire sur de longues distances dans des vésicules (endosomes ou phagosomes) [100].

La microglie est l'acteur de l'immunité innée dans le cerveau. Les cellules de la microglie sont l'équivalent des macrophages. En réponse à l'infection West-Nile, elle est activée. Cela se manifeste par un changement de morphologie et l'expression du facteur d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) à sa surface pour favoriser l'infiltration des leucocytes (non infectés et infectés). Elle exprime également des cytokines pro-inflammatoires. Les cellules de la microglie migrent jusqu'aux neurones infectés pour phagocyter les débris cellulaires.

Les astrocytes participent à la structure du SNC, ils y assurent également le maintien de l'homéostasie. Ils sont également impliqués dans l'immunité. Aussi, en réponse à l'entrée du WNV dans le SNC, les astrocytes vont être activés, changer de morphologie et se multiplier. Comme la microglie, ils assurent une protection des neurones et participent à l'élimination des neurones endommagés. Cependant, le WNV peut infecter les astrocytes et peut s'y répliquer de façon efficace [112].

Ainsi, les astrocytes participent également à la dispersion du virus dans le SNC [113]. Ils vont également produire des cytokines pro-inflammatoires pour stimuler la réponse immunitaire.

A la suite de l'infection par WNV, le virus se réplique dans les neurones et va induire leur mort par apoptose. Cette mort est médiée par la Caspase-3 (Cas-3) exprimée par les neurones eux-mêmes en réponse à l'infection. Une étude comparative sur souris Cas-3KO et sauvage [102] montre que la déficience en Cas-3 induit une diminution de la mortalité des neurones dans le cortex cérébral, le tronc cérébral, le cervelet mais n'a pas d'impact sur la réplication et la dissémination du virus West-Nile. Certaines protéines virales dont la protéine de capsid C et les protéines non structurales NS2B-NS3 associées, peuvent activer respectivement les voies Caspase 3 et Caspase 9 ou Caspase 3 et Caspase 8 et NS3 seul, induit la voie Caspase 8.

La mort des neurones peut être une conséquence de la réplication du virus, entraînant une mort lytique par éclatement des neurones [114]. Il s'agit d'un phénomène courant lors des infections virales.

La microglie induit chez les neurones, une perte de terminaisons synaptiques dans l'hippocampe avec possiblement intervention du complément et une activation par les cellules CD8+ exprimant de l'IFN- γ .

2.6.3. Les réponses cellulaires à l'infection

Paradoxalement, dans le SNC, les mécanismes mis en place pour contenir l'infection peuvent favoriser la dissémination du virus et favoriser l'entrée du virus dans le SNC. Le rôle des chemokines CXCL10, TRAIL est de recruter et d'activer des cellules T CD8+ qui produiront : IFN- γ , Perforine et Granzymes en vue d'obtenir la clairance du virus [115], tout comme l'activation de la microglie. Ces cellules expriment des cytokines et des chemokines telles que : IL-6, IL-12, TNF- α , MMP9, CXCL10, TRAIL [98]. A la suite de l'infection par le virus West-Nile, une réponse immunitaire innée et adaptative se met place. Des cellules impliquées dans la réponse immunitaire

(microglie et astrocytes) sont recrutées et activées. Il y a également production d'un certain nombre de cytokines et d'IFN de type I pour prévenir la dissémination du virus et l'éliminer. Cette réponse immunitaire adaptative se met en place avec infiltration de cellules T et B activées mais également d'autres cellules impliquées dans l'immunité. Ainsi, des leucocytes non infectés mais également des leucocytes infectés entrent dans le SNC. Cela contribue à un entretien de l'infection. Les leucocytes recrutés expriment des Ig-A ou des Ig-G et se retrouvent dans l'espace périvasculaire. Les cytokines sécrétées, en réponse à l'infection WNV facilitent le passage des cellules immunitaires à travers la BHE. Ces cellules vont regagner des zones particulières du SNC. Ainsi, certaines cellules T CD8+ vont se déplacer dans le cervelet, en réponse à un niveau élevé de CXCL10 exprimé par les neurones. Expérimentalement, des souris déficientes en CXCL10 présentent une infiltration réduite de cellules T CD8+ et une charge virale accrue dans le cerveau [116]. Les CD8+ recrutés pour leur action cytotoxique infiltrent le parenchyme. Ils produisent de l'IFN- γ et participent activement dans la clairance en WNV. Les cellules CD4+ infiltrent le SNC et se retrouvent surtout dans l'espace périvasculaire.

L'infection du SNC conduit avec la réplication du virus et la propagation de celui-ci, à un relargage de particules virales et d'antigènes dans la circulation sanguine activant la réponse immunitaire adaptative et entraînant la réquisition de différentes cellules impliquées dans l'immunité.

Les différents types cellulaires recrutés en fonction des zones du SNC : cervelet moelle épinière sont par leur activation, la production de cytokines et leur effet apoptotique ou l'élimination de synapses dans l'hippocampe à l'origine de la neuropathogenèse. En effet, la perte de neurones dans certaines zones a pour conséquence certains signes cliniques bien spécifiques.

Au niveau du SNC, la microglie intervient dans l'élimination des neurones avec des synapses endommagés. Le WNV déclenche la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IFN- β dans la microglie de manière dépendante du Toll-like receptor 3 (TLR3) [117], [118]. Il reconnaît, en effet les ARN double brin produits au cours du cycle viral des virus ARN et donc du virus West-Nile. Il prévient l'infection des neurones par le virus en réprimant sa réplication, notamment en induisant l'expression d'IFN de type I. Une étude comparative sur souris TLR3KO et sauvages infectées par WNV met en évidence, que TLR3 serait impliqué dans un effet protecteur sur les neurones [119].

Au cours des infections WNV, la caspase-12 contrôlerait l'infection dans les neurones. En effet, elle régule TRIM25 (ubiquitine ligase E3) qui va ubiquitiner RIG-I. Ce dernier va médier une expression élevée d'IFN [120].

Expérimentalement, il est montré que l'expression de CCR5 et de son ligand CCL5 est fortement augmentée par l'infection par le WNV dans le SNC. Le CCR5 serait impliqué dans le recrutement des leucocytes (y compris les cellules T CD4+ et CD8+, les cellules NK et les macrophages) dans le cerveau. Les souris déficientes en CCR5 succombent rapidement à l'infection par le WNV et ne sont pas en mesure d'éliminer le virus dans le cerveau pendant la durée de la maladie [121].

Les neutrophiles sont également détectées dans le SNC, mais leur rôle dans l'infection WNV n'est pas encore connu. Ils sont présents dans le liquide céphalo-rachidien de cas humains. Chez les souris infectées par WNV, les neutrophiles auraient une double fonction à savoir : servir de réservoirs pour la réplication du virus dans la périphérie au stade précoce de l'infection, et participer à la clairance virale au stade tardif de l'infection dans le SNC.

3. Les modèles d'étude

Les lignées cellulaires immortalisées et les cellules primaires murines ont longtemps été utilisées pour l'étude du WNV. Ces modèles ont permis de grandes avancées sur la pathogenèse du virus. Cependant, elles présentent de nombreuses limites

3.1. Les modèles cellulaires et les modèles *in vivo*

Les modèles cellulaires utilisées sont souvent des lignées cellulaires immortalisées. Elles sont faciles à amplifier sur une longue période. Ainsi, dans le cas des études de la forme neuroinvasive du virus West Nile *in vitro*, ce constat est fait en fonction de la provenance et du type cellulaire, même s'il s'agit de cellules épithéliales [115], [122].

Pour les études *in vivo*, des modèles murin ou simien sont utilisés. Les expérimentations réalisées sur des primates non humains [100], [123] portant sur le transport axonal du WNV dans le SNC ont été réalisées avec des inoculations en intracrâniens. Concernant le modèle murin : les souris contrôlent l'infection et ne développent pas naturellement de forme neuroinvasive. Les inoculations sont également réalisées en intracrânien. Ce n'est pas une voie classique d'entrée du virus. Pour une inoculation par une voie classique c'est-à-dire la piqure de moustique, il faut recourir à des souris immunodéprimées ou allaitantes qui sont alors sensibles au virus et peuvent développer une forme neuroinvasive. Mais, il y a toujours un biais. En effet, dans sa revue de 2020, Stonedahl [115] évoque les différences entre microglie humaine et microglie de souris [124]. Il existe notamment des niveaux plus élevés d'expression de certains gènes de l'immunité et une durée de vie plus longue pour la microglie humaine. Ces différences peuvent entraîner une modification des résultats lors de la comparaison des infections sur microglie humaine et murine. Le modèle souris n'est pas le plus adapté pour comprendre le rôle de la microglie au cours d'une infection chez l'homme [125]. Si nous nous intéressons à l'équin, le constat est probablement le même.

Des modèles murins d'infection West-Nile sont utilisés pour caractériser la pathogénèse du virus et la voie d'entrée dans le SNC. En fonction du type de souris utilisé, et de la voie d'administration du virus des résultats contradictoires sont obtenus. Pour exemple, des résultats obtenus sur souris C57BL/6 ont mis en évidence une perméabilisation de la BHE alors que les études sur souris Balb/c ne le démontrent pas

[126]. Des études ont été également faites sur souris KO, déficientes pour une molécule supposée impliquée dans les mécanismes d'entrée telles que MMP9, TLR3, ICAM-1. Des résultats contradictoires ont été obtenus dans le cas de TLR3 et de son effet protecteur sur les neurones à la suite d'une l'infection par le virus West-Nile [117], [125].

Les modèles cellulaires *in vitro* et les modèles murins pour les aspects *in vivo*, ne sont pas optimums pour l'étude de la forme neuroinvasive des infections West-Nile chez le cheval ou même chez l'homme. Dans le cerveau, les neurones sont les cibles principales du virus. Il nous semble ainsi pertinent de développer un modèle équin de cellules neurales. Depuis la fin des années 2000, la technologie des iPSC a permis de combler le manque de modèles cellulaires tissu spécifique, d'abord chez la souris, l'humain puis après transposition de la technique chez d'autres espèces d'intérêt dont le cheval. Cette technique est maintenant un outil utilisé pour générer des modèles cellulaires pertinents adaptés aux pathologies des équidés.

3.2. Les cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites ou « induced pluripotent stem cells » (iPSC) sont issues des travaux du groupe de Takahashi et Yamanaka, en 2006 [127]. Ces cellules reprogrammées ont toutes les propriétés de cellules embryonnaires. Elles sont dites « cellules pluripotentes ». Elles ont la capacité à s'auto-renouveler et à se différencier pour donner des cellules spécialisées. Elles peuvent se différencier en tous types cellulaires. Les iPSC sont décrites comme un outil d'étude prometteur en santé humaine ou animale. Ce travail a été récompensé par le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2012, décerné à S. Yamanaka et J. Gurdon.

3.2.1. L'historique

Les premières cellules souches pluripotentes induites ont été obtenues à partir des cellules de fibroblastes murins adultes. Ces cellules ont été transformées en introduisant dans les noyaux 4 gènes codant pour des facteurs de transcription à l'aide d'un vecteur rétroviral. Ces facteurs de transcription sont connus pour être impliqués dans la pluripotence des cellules dans les cellules embryonnaires. Les 4 facteurs choisis interviennent au début de l'embryogenèse : Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc. La même technique a été utilisée pour reprogrammer des fibroblastes humains en iPSC [128]. Une équipe américaine a reproduit la technique également sur fibroblastes humains en apportant comme variantes le remplacement de Klf4 et c-Myc par NANOG et LIN28 [129], [130]. Oct3/4 et Sox2 doivent être conservés car ils sont essentiels pour générer des iPSC.

3.2.2. Les principaux facteurs de reprogrammation

Les quatre premiers sont nommés facteurs de Yamanaka.

>Oct3/4, (octamer-binding transcription factor 4) intervient dans le passage du stade morula au stade blastocyste, ainsi que dans l'auto-renouvellement [131].

>Sox2, (SRY-box 2) est impliqué dans la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules embryonnaires [132].

>Klf4, (Kruppel-like factor 4), joue un rôle dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'auto-renouvellement [133].

>c-Myc, (MYC proto-oncogene) est un oncogène qui s'exprime dans les cellules ayant une forte activité proliférative [134].

NANOG, (Nanog homeobox) intervient dans le maintien de la pluripotence ainsi que dans l'auto-renouvellement des cellules embryonnaires murines [135], [136].

et LIN28, (Lin-28 homolog) interviendrait dans le maintien de la pluripotence [137].

3.2.3. Les vecteurs

Deux types de vecteurs sont disponibles :

>les vecteurs intégratifs : rétrovirus (dont lentivirus). Ils sont très efficaces mais ils peuvent induire des intégrations multiples, des mutations par insertion et induire des tumeurs.

>les non intégratifs : adénovirus, EBV, Sendaï, papillomavirus, plasmides, transposon « PiggyBac », ARNm ou protéines. Ils sont peu efficaces et instables pour la reprogrammation.

Les vecteurs rétroviraux sont utilisés préférentiellement pour générer des iPSC, même si pour les applications *in vitro* ou *in vivo* les vecteurs non intégratifs sont plus sûrs.

3.2.4. Le choix des cellules

Cette technique peut s'appliquer à beaucoup de types de cellules somatiques. Le choix s'oriente vers des cellules faciles à prélever par biopsie telles que les fibroblastes et les kératinocytes. Certains types de cellules sont plus faciles à reprogrammer, ainsi les kératinocytes humains sont plus faciles et plus rapide à reprogrammer que les fibroblastes. Des cellules avec un stade de différenciation peu avancé sont de bons candidats comme les progéniteurs hématopoïétiques et par exemple, les follicules pileux dont la reprogrammation est cent fois plus efficace et deux fois plus rapide que celle des fibroblastes [138].

3.2.5. La différenciation

Plusieurs options sont possibles à partir de mêmes iPSC. Elles ont été recensées dans un tableau par Williams en 2012 [139], à partir des différents protocoles disponibles. Il est quasiment possible d'envisager tous les types cellulaires. En effet, les connaissances actuelles en embryologie, en biologie du développement sont suffisamment avancées. Les connaissances sur les mécanismes des voies de signalisation cellulaire permettent d'induire la différenciation dans une voie choisie, en utilisant des combinaisons de facteurs de croissances et d'inhibiteurs chimiques.

D'autres méthodes utilisent des cellules nourricières « feeder cells » pour induire la différenciation vers un type cellulaire défini. Ces cellules nourricières secrètent des

facteurs de croissances et des cytokines qui vont induire la différenciation des iPSC. Cette méthode est proscrite pour des applications cliniques.

3.3. Le potentiel des iPSC

La production d'iPSC est accessible à partir d'une biopsie de peau et d'une technique de reprogrammation bien maîtrisée. Du point de vue éthique et réglementaire, en fonction des espèces, leur utilisation est plus souple, moins réglementée ou non réglementée par rapport à l'utilisation des cellules souches embryonnaires soumises aux lois de bioéthiques.

Les iPSC donnent accès à des travaux de recherche sur différents tissus, pour lesquels il est parfois difficile ou impossible de mettre en place des cultures primaires qui en plus, ne peuvent être que transitoires. Des applications diverses *in vitro* et *in vivo* sont envisageables.

>La thérapie cellulaire :

Ces cellules offrent des perspectives intéressantes avec des applications *in vivo* telles que : la médecine régénératrice et la thérapie cellulaire pour la maladie de Parkinson, certaines pathologies cardiaques [140]. Leur utilisation est également envisagée en thérapie génique en modifiant le gène à l'origine d'une pathologie à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 pour corriger la mutation par recombinaison homologue puis réimplantation des cellules dans l'organisme.

>La modélisation pathologique :

Les iPSC permettent des études sur les mécanismes physiopathologiques de certaines maladies du sang, cardiaques, hépatiques, oculaires, neurodégénératives et pulmonaires, avec une origine génétique ou pas. Ces modèles cellulaires permettent d'envisager l'étude de maladies génétiques par modélisation, en partant de tissus de patients porteurs de la mutation et en régénérant le tissu, siège principal de la pathologie. Nous pouvons citer des études sur les pathologies suivantes : SLA (sclérose latérale amyotrophique), SMA (amyotrophie spinale), Drépanocytose, DMLA et Diabète juvénile de type1 [140].

D'autres applications sont possibles telles que le criblage de molécules dans une démarche pharmacologique comme pour le syndrome de Rett et la recherche de drogues efficaces.

>La recherche de médicaments :

Des approches, dans un but thérapeutique, comme la recherche d'antiviraux avec par exemple, notre étude sur un modèle d'infection s'approchant des formes neuroinvasives de WNV chez le cheval.

C'est aussi un outil pour tester la toxicité de molécules en cours d'essais cliniques. Ainsi, il est possible d'anticiper d'éventuels effets secondaires de molécules pressenties, sur cellules hépatocytaires ou cellules cardiaques.

>Les organoïdes :

Les iPSC induites dans la voie neurale vont, selon certains protocoles se différencier en différents types cellulaires du système nerveux tels que les neurones et

les cellules gliales : astrocytes et oligodendrocytes. Elles vont s'organiser d'une façon similaire à celle observée lors du développement du SNC et générer des structures complexes en 3 dimensions appelées organoïdes cérébraux qui miment au mieux les tissus du système nerveux et ont une densité cellulaire plus proche du tissu *in vivo*. Les organoïdes constituent ainsi des outils pertinents pour l'étude des virus neurotropes [141]. Ils permettent en effet, l'étude de multiples aspects de la pathogenèse virale. Les organoïdes sont également de bons outils pour tester l'efficacité des agents antiviraux sur les virus neurotropes dans un environnement 3D plus physiologiquement pertinent. Dans sa revue de 2022, Depla a recensé que les organoïdes sont principalement utilisés pour étudier des virus affectant le développement du SNC tels que le ZIKV (la moitié des publications) et le HCMV. Les autres *Flavivirus* qui ont été étudiés sont le JEV et le DENV. Pour le moment, aucune publication ne mentionne leur utilisation pour l'étude du WNV.

Ces modèles sont cependant encore perfectibles car des éléments impactent les résultats et rendent difficile la comparaison entre les études : ^{1/}le stade de développement des organoïdes, ^{2/}l'hétérogénéité des organoïdes due à des protocoles non normalisés.

Ils présentent des limites qui peuvent également être corrigées. Ils ne contiennent pas de microglie, les cellules immunitaires résidentes du SNC. La BHE et la vascularisation sont également absentes, or elles sont importantes notamment pour l'étude de la neuroinvasion.

Les organoïdes cérébraux sont des outils pertinents en évolution pour les rendre encore plus complexes et performants. La technique se développe également en vue de générer des organoïdes chez des espèces animales d'intérêt afin de disposer de modèles physiologiques spécifiques de l'espèce.

3.4. Les avantages de ce modèle 2D pour notre étude

Les iPSC semblent être un outil robuste et prometteur pour l'espèce équine. Chez le cheval, il est difficile de générer des cellules souches embryonnaires. En effet, il est difficilement concevable de sacrifier des embryons qui ont une valeur de 4000 euros environ. De plus, les connaissances sur les étapes précoces de l'embryogénèse sont moins avancées que pour l'homme et la souris et il est avancé que le maintien de la pluripotence des cellules est d'une façon générale plus complexe pour les espèces domestiques.

Les iPSC sont une bonne alternative et ouvrent une porte sur l'étude de pathologies diverses et la génération des modèles cellulaires appropriés durables dans le temps. La transposition de cette technologie sur des modèles animaux est en cours. Ainsi, chez l'équin, les premiers modèles sont décrits en 2011 [142]. Les kératinocytes sont un meilleur support que les fibroblastes. Ces cellules ont en effet, une meilleure plasticité pour générer différents tissus par différenciation. La littérature rapporte ainsi leur différenciation en neurones, en cellules de cartilage, de muscle, et en des épithéliums pulmonaire et gastrique [143].

Cette technologie est relativement longue à mettre en place. Chez l'équin, les iPSC sont étudiées pour envisager leur utilisation en médecine régénératrice [144]. Pour la médecine régénératrice, il est difficile d'envisager des autogreffes surtout dans le cas de pathologies à évolution rapide. Les allogreffes semblent prometteuses chez l'équin [144]. Plusieurs applications pour ces cellules dérivées d'iPSC, prêtes à l'emploi sont déjà envisagées telles que des pathologies nécessitant une régénération de tissus musculo-squelettiques, des plaies, de troubles auto-immuns, ou pour la neurorégénération.

Des modèles de cellules neurales équines dérivées d'iPSC peuvent permettre une meilleure compréhension de la neurogenèse chez le cheval. Les chevaux souffrent d'environ 90 maladies génétiques proches des maladies humaines, telle que la sclérose latérale amyotrophique. C'est ainsi la perspective de faire avancer conjointement les recherches sur ces pathologies, notamment celles touchant les neurones grâce aux neurones dérivés de iPSC.

Environ une trentaine de travaux sur cellules différenciées dérivées d'iPSC équines sont rapportés dans la littérature, portant sur des modèles de cellules cardiaques, musculaires, osseuses et neurales. L'utilisation de neurones corticaux dérivés d'iPSC pour mimer les infections WNV sur modèle équin est décrite [145] mais il n'y a pas eu d'autres publications depuis et l'étude de l'infection par d'autres virus neurotropes n'est pas décrite dans la littérature pour le moment.

4. Les molécules antivirales

Alors que trente ans seulement, séparent la découverte du premier antibiotique et de la première molécule antivirale, plus de dix-mille antibiotiques ont été mis sur le marché et peut-être, uniquement une centaine de molécules antivirales approuvées, alors qu'actuellement, le constat suivant peut être fait : il y a peu d'antiviraux disponibles en santé humaine et animale.

4.1. Les généralités

4.1.1. L'historique

La première molécule antivirale approuvée fut l'idoxuridine en 1963 pour traiter les infections par le virus de l'Herpès Simplex 1 (HSV-1). Plus récemment, les découvertes de molécules marquantes sont, depuis la fin des années 1990 celles ciblant le virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV) et dans les années 2010, celles dirigées contre le virus de l'hépatite C (HCV). Un bilan sur cinquante années de recherche sur les antiviraux met en évidence, seulement 90 molécules approuvées pour traiter seulement 9 infections virales humaines, alors que des milliers de molécules ont été testés (Figure 14) [146], [147].

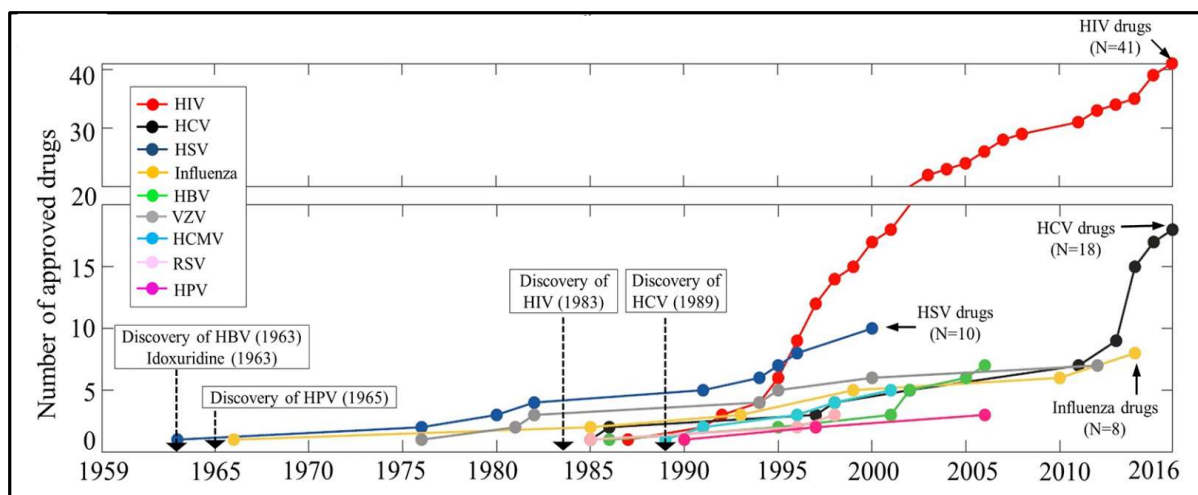


Figure 14 : **Nombre de drogues approuvées par la FDA entre 1963 et 2016** pour 9 virus différents : HIV, HCV, HSV, Influenza, HBV, VZV, HCMV, RSV et HPV. [147]

4.1.2. La classification

Les molécules peuvent être classées en deux groupes :

- > Les molécules antivirales qui ciblent directement le virus sont dites : **DAA « Direct Acting Antiviral »**. Elles vont cibler spécifiquement une des protéines virales impliquées dans des interactions avec l'hôte ou dotées d'une activité enzymatique. Par conséquent, ces molécules ciblent une étape du cycle viral : attachement, fusion, décapsidation, réplication, assemblage, maturation, libération. Leur utilisation pour cibler des virus à ARN, est parfois associée à des mutations de résistance, (il n'y a pas de relecture pour corriger les erreurs de séquences lors de la réplication), il est alors possible d'associer une autre molécule ou de l'interféron pour contrecarrer ce phénomène ou de choisir des cibles hautement conservées.

- > Les molécules qui ciblent l'hôte, c'est-à-dire un facteur cellulaire nécessaire au virus pour sa réplication sont les **HTA « Host Targeting Agent »**. Le virus se réplique en effet, uniquement, dans une cellule hôte, en détournant des mécanismes cellulaires. Aussi, une drogue ciblant un facteur cellulaire doit être efficace sur le virus sans pour autant être toxique pour la cellule, l'homme ou l'animal. Elle doit être « safe ».

4.1.3. Les antiviraux à large spectre

A cette classification, il faut ajouter la notion d'antiviraux à large spectre ou **BSAA « Broad-Spectrum Antiviral Agents »**. Un des objectifs de cette recherche d'antiviraux à large spectre est d'identifier des molécules efficaces sur plusieurs virus d'un même genre, d'une même famille ou communs à plusieurs familles. Il s'agirait alors de molécules pan-virales [148]. Deux points appuient cette démarche :

- 1- Le processus de découverte d'une molécule antivirale efficace et approuvée peut prendre plusieurs années et les travaux de recherche ont un coût élevé. Pour exemple, il a fallu trente ans de recherches pour proposer un traitement contre le virus de l'hépatite C (HCV). De Clercq en 2016 estimait que 200 virus responsables de

pathologies graves chez l'homme sont encore sans traitement et/ou vaccin [147]. Ainsi, disposer d'une seule molécule pour plusieurs virus permettrait une réduction des coûts.

2- Nous sommes dans un contexte d'émergence de nouveaux virus comme le SARS-CoV2 et de ré-émergence comme le WNV. Aussi, anticiper en identifiant une ou plusieurs molécule(s) à large spectre, susceptibles de constituer une réponse immédiate à l'émergence de nouveau virus est une bonne stratégie.

Un autre concept apparu en 2004, introduit par Ashburn et Thor s'est développé : le **repositionnement de molécules** « **Drug repositioning** » disposant déjà d'une autorisation de la Food and Drug Administration (FDA) pour une autre activité en clinique [149]. Ainsi, des étapes de validation sont déjà passées, cela permet de gagner du temps et de réduire les coûts. L'amantadine et les statines que nous présenterons plus tard, sont de bons exemples.

Les antiviraux à large spectre peuvent avoir un autre intérêt : celui de cibler des virus pathogènes pour l'homme mais aussi pour des espèces animales d'intérêt, tel que le cheval. Pour la filière équine, un animal malade représente une perte économique importante (coût de soins, processus de récupération long, manque à gagner si absence de courses hippiques par exemple). La recherche d'antiviraux destinés aux chevaux, s'appuie beaucoup sur les antiviraux déjà disponibles en santé humaine. Ainsi, pour traiter les herpesvirus équins, les anti-herpétiques destinés à l'homme ont été testés [150]. Beaucoup de virus pathogènes pour le cheval ont leurs équivalents chez l'Homme et certains virus dits zoonotiques affectent l'Homme et le cheval.

4.1.4. Les antiviraux contre des arbovirus neurotropes

Parmi ces virus zoonotiques affectant l'Homme et le cheval, beaucoup sont des arbovirus neurotropes tels que les *Flavivirus* : WNV, JEV et les *Alphavirus* : V/E/W/EEV. Ces virus neurotropes sont souvent dangereux uniquement s'ils entrent dans le SNC. Cette spécificité induit une difficulté supplémentaire pour la recherche d'antiviraux. Ils doivent pouvoir traverser la BHE. Or, cette structure qui a un rôle protecteur, en isolant le SNC des agressions extérieures est connue pour être « imperméable ». Ainsi, l'entrée se fait beaucoup par diffusion passive. Les échanges via la BHE sont minimes et impliquent la circulation sanguine. Il faut donc tenir compte de ces critères. La problématique est la même pour l'Homme et le cheval et peut s'inscrire dans la démarche « one health ». Quelles sont les pistes pour se lancer dans cette identification de molécules antivirales destinées à traiter la forme neuroinvasive des infections West-Nile chez les chevaux ?

4.2. Les antiviraux à action directes (DAA)

La majorité de ces antiviraux sont des analogues de nucléosides ou pour certains des analogues de nucléotides. Ils interviennent après incorporation dans la chaîne nucléotidique en agissant comme terminateur de chaîne ou par encombrement

stérique. Ils sont dans l'ensemble bien tolérés, car ils sont spécifiques, pour la majorité, de polymérases virales. Cependant, les analogues spécifiques des ADN polymérases peuvent interférer avec la synthèse de l'ADN mitochondrial. Cela a un effet cytotoxique sur certains organes dont le foie et le cœur.

Certaines de ces drogues, avant d'être utilisées comme antiviraux, étaient initialement utilisées dans le traitement de certains cancers. C'est le cas de la cytarabine, la gemcitabine, la mercaptopurine, la cladribine, la décitabine, le fluorouracil, la fludarabine et la nelarabine.

Les premiers analogues de nucléosides identifiés ciblent spécifiquement les *Herpesvirus* (HSV, HCMV, VZV). L'acyclovir fût le premier analogue acyclique de guanosine cité par Nick Oliver en 1974. Puis le ganciclovir, le penciclovir ont été identifiés. Le valacyclovir, le valganciclovir et le famciclovir sont respectivement leurs prodrogues. Ils agissent comme terminateur de chaîne en bloquant l'élongation de l'ADN viral. Des analogues de nucléotides : l'adefovir, le tenofovir, le cidofovir sont développés dans les années 1980, et ciblent les *Herpesvirus*, [151]. L'adefovir, le tenofovir, ont un spectre plus large puisqu'ils ciblent également le HBV et le HIV.

Certains analogues de nucléosides nommés Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) sont spécifiques des transcriptases réverses et sont utilisées dans le traitement contre le HIV. La zidovudine (AZT : azidothymidine) est le premier découvert en 1985. D'autres seront découverts et utilisés par la suite pour le traitement contre le HIV : le didanosine, l'abacavir, l'emtricitabine, la stavudine et contre le HBV : l'emtricitabine, la lamivudine. Ils partagent le même mode d'action et sont des 2',3'-dideoxynucleoside analogues en compétition avec les désoxynucléotides, incorporés par la reverse transcriptase. Ils agissent comme des terminateurs de chaîne.

A la fin des années 1980, les Non Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) sont découverts. Ils agissent différemment par rapport aux NRTIs. Ils se lient au site allostérique de la Réverse Transcriptase (RT) et induisent un changement de conformation rendant le site catalytique inactif. La réplication est stoppée.

De même, des Non-Nucléosides Inhibiteurs (NNIs), moins proches que les Nucléosides Inhibiteurs (NIs) de la structure du site à mimer sont développés. Ils sont comme des échafaudages hétérocycliques agissant comme un inhibiteur allostérique avec un spectre d'activité étroit.

4.2.1. Les DAA et les *Flavivirus*

La stratégie pour une recherche d'antiviraux efficaces contre WNV, repose beaucoup sur une approche identifiant des antiviraux à large spectre [68]. Les analogues de nucléosides (NIs) sont de bons candidats [152]. Pour le genre *Flavivirus*, les cibles sont des domaines conservés sur les protéines virales non structurales, dotées d'une activité enzymatique, impliquées dans le cycle viral. Leurs séquences et leurs structures tridimensionnelles sont bien décrites. Ces protéines sont bien conservées dans le genre *Flavivirus* (60 % d'homologie de séquences au minimum) et elles n'ont pas d'homologues cellulaires. Le tableau 4 récence les molécules ou les groupes de

molécules entrant dans la catégorie des DAA, actifs sur WNV ou sur les *Flavivirus*, déterminés *in vitro* ou *in vivo* [153].

Inhibitors of WNV proteins.				
Viral target	Compound	Experimental testing	Virus	References
Envelope protein	substituted pyrimidines	<i>in vitro</i>	Flaviviruses	[76]
	delphinidin, epigallocatechin gallate	<i>in vitro</i>	DENV, WNV, ZIKV	[77]
NS2B-NS3 protease	heparan sulfate mimethics	<i>in vivo</i> for DENV, JEV	Flaviviruses	[78]
	competitive inhibitors	<i>in vitro</i>	WNV, DENV	[99,100]
	allosteric inhibitors	<i>in vivo</i> for ZIKV	Flaviviruses	[101,103,108,109]
	erythrosin B	<i>in vitro</i>	Flaviviruses	[102]
	compounds containing a 4 benzyloxyphenylglycine residue	<i>in vitro</i>	DENV, WNV	[104]
	palmitate	<i>in vitro</i>	DENV, WNV, YFV	[105]
	aprotinin	<i>in vitro</i>	Flaviviruses	[110]
	Arginine-derivatives substrate analogues	<i>in vitro</i>	WNV	[111–114]
	Amino Terminal Copper and Nickel Binding (ATCUN) Peptides	enzymatic assays	WNV	[115]
	2-arylidene Indan-1,3-diones	<i>in vitro</i>	WNV	[116]
	3-alkylpyridinium compound	enzymatic assays	WNV	[117]
	4-(guanidinomethyl)-phenylacetyl-Lys-Lys-Arg-NH ₂	<i>in vitro</i>	WNV	[118]
	phosphonate diphenyl esters	<i>in vitro</i>	WNV	[119]
	benzothiazole and pyrrolone compounds	<i>in vitro</i>	DENV, WNV	[47]
NS3 helicase	ivermectin	<i>in vitro</i>	Flaviviruses	[121]
NS4B protein	lycorine and derivatives	<i>in vitro</i>	Flaviviruses	[122–124]
	NSC 12,155	<i>in vitro</i>	Flaviviruses	[126]
NS5 MTase/GTase	nucleoside analogues	<i>in vitro</i>	WNV	[125,126]
	Capping enzyme inhibitors, BG-323	<i>in vivo</i>	DENV, WNV, YFV	[127,128]
NS5 RdRp	nucleoside analogues	<i>in vivo</i>	Flaviviruses	[130–136,138–142]
	nucleoside analogue, 7-deaza-2'-C-methyladenosine (7DMA)	<i>in vivo</i>	Flaviviruses	[130]
	nucleoside analogue, favipiravir (T-705)	<i>in vivo</i>	Flaviviruses	[131,136,138–140]

Tableau 4 : Les antiviraux à action directes (DAA) contre WNV et d'autres *Flavivirus* [153]

La majorité des molécules ciblent des sites spécifiques sur ces protéines jouant un rôle essentiel dans la réplication des *Flavivirus*. Cet aspect est présenté dans la revue de Felicetti et al. (2020) [68].

Précédemment, les travaux pour la mise au point des antiviraux ciblant le HCV, par exemple ont montré que des cibles telles que NS5 et NS3 sont des cibles de choix. Trente années de travaux ont abouti à la découverte de molécules maintenant couramment utilisées telles que le sofosbuvir, le dasabuvir, le siméprévir et le bocéprévir. Ces deux protéines sont également ciblées chez les *Flavivirus* dont WNV, car elles sont : -1 indispensables au cycle viral, -2 hautement conservées (faible taux de mutation) et -3 ne partagent pas des fonctions avec des enzymes cellulaires.

Ainsi, NS5 est sélectionnée pour ses activités polymérase et méthyltransférase. L'inactivation de la **NS5RdRp** peut être obtenue en visant directement l'activité polymérase ou par blocage de l'interaction NS5/NS3, indispensable à cette activité. Sur la **NS5MTase**, le site N7méthylation est une cible pour des inhibiteurs. La NS3 est désignée pour son activité protéase et hélicase et la stratégie serait d'inhiber l'interaction **NS2B/NS3Pro**, indispensable pour cette activité protéase et l'activité hélicase sur la partie C-terminale **NS3ATPase/hélicase**.

Sur la **glycoprotéine E**, c'est une région impliquée dans les changements de conformation au cours de la fusion, présente entre DI et DII qui est la cible des antiviraux à large spectre.

Toutes les molécules listées dans le tableau 4, ne seront pas présentées dans les paragraphes suivants. Les molécules décrites sont représentatives d'un mode d'action sur les différentes protéines virales ciblées. La figure 15 permet de localiser leur action au cours du cycle viral dans la cellule.

4.2.2. Les DAA visant la polymérase virale

Ce paragraphe liste des analogues de nucléos(t)ides connus, qui ont montré une efficacité contre des *Flavivirus* incluant quelquefois WNV.

> La **ribavirine** est le premier analogue de nucléotide synthétique décrit (1972) pour avoir une activité à large spectre pour des virus à ARN : RSV, Influenza virus, HCV. Elle est autorisée depuis 1999 et aurait plusieurs modes d'action. Elle inhibe la inosine-5'-monophosphate (IMP) déshydrogénase avec pour conséquence le blocage de la synthèse du GTP et l'inhibition de l'ARN polymérase. Elle pourrait avoir un effet direct sur certaines polymérases. Elle a aussi un effet immunomodulateur [179], en stimulant la réponse Th1 et interfère avec le capping de l'ARN viral. La ribavirine est décrite pour avoir un effet antiviral contre le WNV sur cellules neurales humaines (Human oligodendroglial (OL)), mais également un effet cytopathique [154]. La ribavirine est utilisée pour des traitements d'infections causées par les virus Lassa, Hantaan et La Crosse. Pour ce dernier, il est montré que la ribavirine se retrouve dans le liquide céphalorachidien. C'est un plus pour le traitement des infections neuro-invasives [154].

> Le **2'-C-méthylcytidine** agit sur la NS5RdRp des *Flavivirus*. Il inhibe la synthèse de l'ARN Viral, en agissant comme terminateur de chaîne. 2'-C-méthylcytidine (2'-CMC), il a un effet antiviral à large spectre. Des études, *in vitro* ont montré un effet inhibiteur sur cellules BHK-21 infectées par des virus à ARN tels que DENV-1, Réovirus, WNV, YFV, avec des EC₅₀ respectivement de 95, 26, 80, et 75 µM. 2'-CMC inhibe la réplication de réplicon du HCV (EC₅₀ = 2,2 µM) [155].

> Le **sofosbuvir** a été approuvé en 2013 pour le traitement des infections à HCV. Cet analogue de nucléoside inhibe la polymérase en se liant au site catalytique de celle-ci. Il est également, actif sur la NS5RdRp de *Flavivirus* (ZIKV, DENV, YFV) *in vivo* et *in vitro* [156].

> Le **remdesivir (GS-5734)** est un analogue de nucléoside développé initialement pour lutter contre le virus Marburg et le virus Ebola. Le remdesivir triphosphate inhibe la RNA polymérase de *Flavivirus* : DENV, WNV, TBEV [157].

> Le **favipiravir (T-705)** est un dérivé de la pirazine. Initialement décrit pour les infections par le virus Influenza, *in vitro* et *in vivo* sur un modèle rongeur [158] il est aussi efficace sur d'autres virus, notamment les *Flavivirus*, *Bunyavirus*, *Alphavirus* et

virus Ebola [159]. Pour exemple, pour WNV sur cellules VERO ($EC_{50} = 337 \mu M$) et *in vivo* avec un traitement de 200mg/kg, 4h après infection, 2 fois par jour, 9/10 souris et 8/10 hamsters [126] survivent à l'infection. Il est proposé comme molécule antivirale à large spectre. Une controverse existe quant à son efficacité sur les cellules neurales dérivées d'iPSC humaines. En effet, alors que Lanko *et al.* (2017) montre qu'il est inefficace sur des hNPC infectées par Zika, d'autres auteurs Kim *et al.* (2018) mettent en évidence un rôle antiviral sur le même type cellulaire [160]-[161].

> La **gemcitabine** est un analogue de déoxycytidine interférant avec la synthèse des ADN et ARN, décrit depuis le milieu des années 2010 comme un antiviral à large spectre sur HSV-1, les coronavirus (MERS-CoV, SARS-CoV), Zika virus (ZIKV), HCV, poliovirus (PV), Influenza A virus (IAV), HIV et entérovirus (EV) [162]. Récemment, il a été montré que la gemcitabine réprime l'infection et la réplication du virus ZIKA dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) humain ($EC_{50} = 0,01 \mu M$; $CC_{50} > 10 \mu M$) [163]. Une activité antivirale de la gemcitabine est également décrite pour HCV sur cellules Huh-7 et pour HIV sur cellules U373-MAGI-CXCR4_{CEM}, avec des EC_{50} de 12 nM et 16,3 nM, respectivement (concentration inférieure à celle utilisée lors des traitements anticancéreux) [164]–[166]. La gemcitabine induit en parallèle l'expression des ISG, des effecteurs de l'immunité innée, et ce mécanisme est corrélé à l'inhibition de la biosynthèse des pyrimidines [167].

4.2.3. Les DAA visant d'autres protéines virales

Les molécules sont décrites pour avoir une activité antivirale contre WNV et d'autres Flavivirus.

> L'**ivermectine**, une lactone macrocyclique produite par *Streptomyces avermitilis* est un antiparasitaire découvert en 1975, efficace sur de nombreux parasites. C'est également un inhibiteur de l'helicase NS3 de *Flavivirus* qui a été testé sur YFV, DENV et WNV [66]. Les tests ont confirmé une inhibition de l'activité de la NS3helicase de WNV avec une IC_{50} de 350 ± 40 nM. L'ivermectine agit comme un inhibiteur non compétitif en se liant au complexe protéine ARN pour inhiber l'activité helicase. L'Ivermectine a un autre mode d'action, il se lie et bloque le transport nucléaire de protéines et facteurs viraux dans le noyau, si le virus utilise le noyau dans son mécanisme de réplication. Sa cible est une protéine cellulaire : la « importing alpha protein » ($IMP\alpha$) impliquée dans les transports dans et hors du noyau. En présence d'Ivermectine, l'importation de NS5 dans le noyau est réprimée, Il y a inhibition de la réplication des *Flavivirus* [168]. Un autre mécanisme a été proposé, l'ivermectine pourrait inhiber le « alpha 7 neuronal nicotinic acethylcholin receptor » [169].

> L'**aprotinin** ou bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) inhibe la protéase NS2B/NS3 avec une constante d'inhibition $K_i = 26$ nM en bloquant l'interaction de NS2B et NS3

[170]. L'aprotinin a un IC50 sur l'effet cytopathique de souches de SARS-CoV-2 infectant des cellules Caco2 dans une gamme de concentration de 0,81 à 1,03 μM [171].

> L'**erythrosin B** inhibe l'interaction de NS2B et NS3. Il agit comme un inhibiteur allostérique. C'est un complément alimentaire approuvé par la FDA (Food of drug Administration). Lors d'une étude sur cellules A549, un effet antiviral sur WNV a été mis en évidence, avec une EC50 de 0,66 μM et un Index de Sélectivité (SI) supérieur à 227. Sur ces cellules, la CC50 est supérieure à 150 μM . Dans cette même étude, un effet antiviral sur d'autres *Flavivirus* est montré : DENV2, ZIKV, YFV et JEV avec respectivement des EC50 de 1,2 ; 0,62 ; 0,57 et 0,35 μM et des index de sélectivité respectivement supérieurs à 428 ; 125 ; 242 ; 263. L'effet antiviral de l'erythrosin B sur HNPC infectées par ZIKV a conduit aux valeurs suivantes : CC50 supérieure à 150 ; EC50 de 1,39 μM et un index de sélectivité supérieur à 108 [172].

> Le **lycorine** est un alcaloïde naturel de plante qui réprime la réplication de l'ARN viral en agissant sur NS4B [173].

4.2.4. Les DAA à large spectre

L'ivermectine est l'exemple. Les travaux de Campbell et Omura montrent l'activité antivirale de l'ivermectin dite : « wonder drug » et ils reçoivent le prix Nobel de médecine en 2015, pour leurs travaux [174] [175]. Cette molécule est déclarée sur la liste des médicaments essentiels de l'organisation mondiale de la santé [176].

La ribavirine, le 2'CMC, la gemcitabine et le favipiravir sont également identifiés comme antiviraux à large spectre.

L'erythrosine B est décrit comme un potentiel inhibiteur pan-flavivirus (DENV, ZIKV, YFV, [167] et le lycorine [168] et l'aprotinin [165] sont décrits comme des antiviraux à large spectres.

4.3. Les antiviraux ciblant l'hôte (HTA)

Ces molécules peuvent se classer dans deux groupes selon leur fonction.

1-L'objectif est par exemple de stimuler le système immunitaire pour déclencher une réponse antivirale. Des molécules telles que l'**interféron** ou l'**imiquimod** sont utilisées. L'interféron de type I déclenche une réponse immunitaire ciblant le virus. L'imiquimod stimule la sécrétion de cytokines comme l'IFN, le TNF, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8 et stimule donc la réponse immunitaire. Il est utilisé lors de l'infection par le Papillomavirus humain (PVH) en clinique et semble efficace sur le virus respiratoire syncytial (RSV) [177].

2-L'objectif est d'interférer avec des facteurs cellulaires ou des voies de signalisation détournées par le virus pour sa réplication (facteurs proviraux). Ces molécules peuvent par exemple :

-interférer avec l'internalisation des virus, tel l'**arbidol** qui inhibe l'entrée clathrine dépendante de plusieurs virus dont notamment des *flavivirus*. Il y a inhibition de la formation des vésicules d'endocytose [178].

-empêcher comme l'**amantadine**, la décapsidation du virus et ainsi sa diffusion dans la cellule pour rejoindre son compartiment de réplication.

-interagir avec les métabolites cellulaires réquisitionnés pour la synthèse des acides nucléiques. Le **brequinar** et l'**acide mycophénolique** sont des inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques.

-interférer avec la synthèse des lipides, comme les **statines** au nombre de 9 (**atorvastatine, lovastatine, fluvastatine, simvastatine, pravastatine**, rosuvastatine, pitavastatine, mévastatine, cerivastatine) et le **metformine**.

Pour citer un exemple de HTA qui a fait ses preuves, il existe le maraviroc, un antagoniste du Chemokine-recepteur 5 (CCR5), utilisé pour le traitement du HIV [68].

4.3.1. Les HTA et les *Flavivirus*

Les investigations ont commencé au début des années 2000. En un peu plus de vingt ans de recherche, avec une trentaine de publications par an. Le tableau 5 liste les HTA pressentis.

Inhibitors of host factors required for WNV infection.				
Host target	Compound	Experimental testing	Virus	Reference
Antiviral response	Tat-beclin 1, inducer of autophagy	<i>In vivo</i>	WNV, CHIKV	[151]
	KIN140, activator of innate immunity	<i>In vitro</i>	WNV, DENV, HCV	[153]
Factors involved in viral entry and replication	Receptor tyrosine kinase inhibitors	<i>In vitro</i>	Flaviviruses, CHIKV	[154]
	Nanchangmycin	<i>In vitro</i>	Flaviviruses, CHIKV	[154]
	Obatoclax	<i>In vitro</i>	Flaviviruses, alphaviruses	[155]
	Sirtinol, inhibitor of lysine deacetylases	<i>In vitro</i>	flaviviruses, alphaviruses, bunyaviruses	[156]
	Ivermectin, inhibitor of importins	<i>In vivo</i>	DENV	[159]
	GW5074, inhibitor of importins	<i>In vitro</i>	Flaviviruses	[162]
	Brequinar, dihydroorotate dehydrogenase inhibitor	<i>In vitro</i>	Flaviviruses	[163]
	DDX3X inhibitors	<i>In vitro</i>	Flaviviruses	[166–168]
	Amantadine	<i>In vitro</i>	WNV	[169]
	Protein kinase C family inhibitors	<i>In vitro</i>	WNV	[170]
Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus	NGI-1, OST inhibitor	<i>In vitro</i>	Flaviviruses	[173]
	iminosugar derivatives, inhibitors of α-glucosidases	<i>In vivo</i> , clinical trial in patients with dengue fever	Flaviviruses and other viruses	[174,176,179]
	Furin inhibitors	<i>In vitro</i>	WNV, DENV	[118,180]
	Covalent inhibitors targeting reactive cysteines	<i>In vitro</i>	Flaviviruses and other viruses	[182]
Lipid metabolism	Inhibitors of acetyl-CoA carboxylase	<i>In vivo</i>	WNV	[183,184]
	Inhibitors of the SREBP pathway	<i>In vitro</i>	Flaviviruses	[185,186]
	Imipramine	<i>In vitro</i>	Flaviviruses, CHIKV	[187]
	Activators of AMP-activated protein kinase	<i>In vitro</i>	Flaviviruses	[188]

Tableau 5 : Les antiviraux ciblant l'hôte (HTA) contre WNV et d'autres *Flavivirus* [153]

Certaines molécules listées dans le tableau 5, sont présentées dans le paragraphe suivant. Les molécules décrites sont représentatives d'un mode d'action sur différentes cibles cellulaires. La figure 15 permet de localiser leur action dans la cellule.

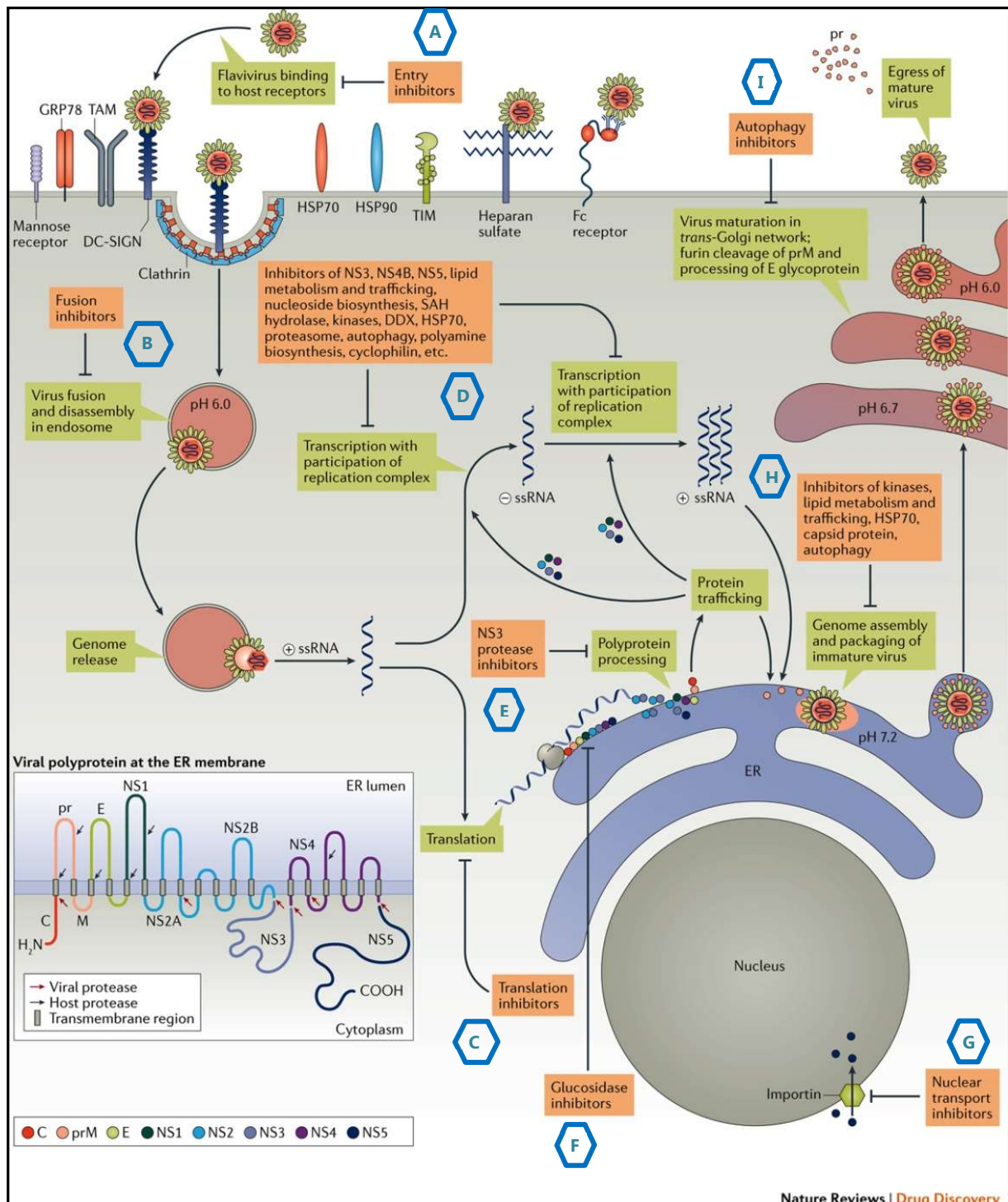


Figure 15 : Cibles envisageables pour les différents antiviraux DAA et DHA. [179]

G	Ivermectine	H	Statines ; Metformine ;	B	Arbidol	E	Aprotinine ;
D		D	Inhibiteurs de Cyclophiline				ErythrosinB
D	Ribavirine ; 2CMC ; Remdesivir ; Sofosbuvir ; Favipiravir ; Lycorine ; Gemcitabine						

4.3.2. La description des quelques HTA

>L'**acide mycophénolique** est un inhibiteur de l'IMPDH (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase) [179]. Il induit une déplétion en purines et interfère ainsi avec la synthèse des acides nucléiques cellulaires et viraux. Il est décrit comme ayant une activité antivirale et immunosuppressive. Il induit l'expression des ISG indépendamment de la voie Interféron. Son effet antiviral s'exerce sur différents virus : HCV, virus de l'hépatite E (HEV), MERS-CoV, DENV, YFV, HBV, WNV, Chikungunya virus (CHIKV), et IAV [162], [180], [181].

>Le **brequinar** est un inhibiteur de la déhydrogénase dihydroorotate (DHODH), une enzyme impliquée dans la voie synthèse des pyrimidines [173]. Il a été découvert au milieu des années 1980 et sélectionné pour le traitement de cancers et ses effets immunosuppresseurs. L'effet antiviral du bréquinar est démontré *in vitro* sur des *Flavivirus* en cellules VERO : DENV $EC_{50} = 0,78 \mu M$; WNV, YFV, et les WEEV, VSV [182]. L'inhibition de DHODH induit une déplétion en pyrimidines, cela interfère avec la synthèse des acides nucléiques. Le DD264, un composé initialement identifié comme activateur des gènes régulés par les interferon-stimulated response element (ISRE), décrit comme un autre inhibiteur de DHODH présente une activité antivirale contre certains virus dont WNV, CHIKV [183]. Les inhibiteurs de DHODH, induisent également l'expression des ISG selon un mécanisme qui est mal connu mais ne semble pas être semblable à celui des inhibiteurs d'IMPDH.

>Des **analogues de nucléos(t)ides** comme cela est démontré pour la ribavirine, qui a un effet inhibiteur de l'IMPDH [184]. Ce mécanisme serait également un autre mode d'action décrit depuis une dizaine d'année. Ils interfèrent avec la synthèse des nucléos(t)ides cellulaires. Cela induit une déplétion en nucléos(t)ides, ce déséquilibre induit une réponse immunitaire innée qui, combinée au mécanisme de blocage de la synthèse des ARN viraux, contribuent aux effets antiviraux [162], [185].

>L'**arbidol** (Umifenovir) est un antiviral mis au point et utilisé en Russie et en Chine pour le traitement des infections par le virus Influenza. Il a par la suite montré une activité antivirale large sur un certain nombre de virus ARN et ADN nus ou enveloppés dont HCV [172]. Il agit comme un inhibiteur de la fusion des membranes plasmiques, des endosomes et des particules virales en s'intercalant dans les membranes lipidiques. Il a également des effets immunomodulateurs en induisant l'interféron et en activant les macrophages. Des essais sur différents *Flavivirus* et sur plusieurs modèles cellulaires ont montré par exemple sur VERO CCL-81 et sur des astrocytes issus de cortex cérébral humain (HBCA), une inhibition pour 2 souches de WNV : Eg101 et 13-104 à une MOI 0,1 et une inhibition sur VERO avec une EC_{50} de $19 \mu M$ et un SI 4,8 [172].

>L'**amantadine** est la première molécule approuvée pour le traitement des infections par le virus Influenza 1966. L'amantadine bloque le transport des ions H^+ à travers les

canaux protéiques M2 à l'intérieur des particules virales, empêchant ainsi la décapsidation des particules du virus dans les endosomes. Ce composé a été abandonné pour le traitement des infections par le virus influenza en raison de fréquents phénomènes de résistance. Il est testé ou utilisé depuis pour les maladies avec des signes neurologiques telle que la maladie de Parkinson [186]. Les formes neuroinvasives des infections WNV ont des similitudes avec la maladie de Parkinson. A partir de ce constat, les médicaments antiparkinsoniens sont testés pour des effets antiviraux sur WNV. Ainsi, l'amantadine inhibe la réplication du WNV sur cellules neurales humaine SH-SY5Y avec une $IC_{50} = 370 \mu M$; une $CC_{50} = 150 mM$ et un SI = 405 [187]. Cette molécule est décrite pour avoir un effet inhibiteur de la réplication du virus de la Dengue, un autre *Flavivirus* dès 1990 [188].

> Les **inhibiteurs de cyclophilines** ciblent une famille de 20 protéines chaperonnes : les Cyclophilines (Cyps) présentes chez les mammifères notamment. Ces petites protéines cellulaires ont une activité enzymatique peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (PPIase). Elles sont impliquées dans le repliement des protéines, l'activation des lymphocytes T et le transport intracellulaire des protéines. Elles interviennent également lors du cycle viral de nombreux virus de genres et de familles différentes (Flavivirus, Coronavirus, Bunyavirus, Adenovirus, Paramyxovirus, Rotavirus, Papillomavirus). Les Cyps sont ainsi une cible idéale pour le design d'une molécule antivirale à large spectre. Cependant, leur rôle dans le cycle des *Flavivirus* n'est pas formellement établi car les études sont contradictoires [189], [190].

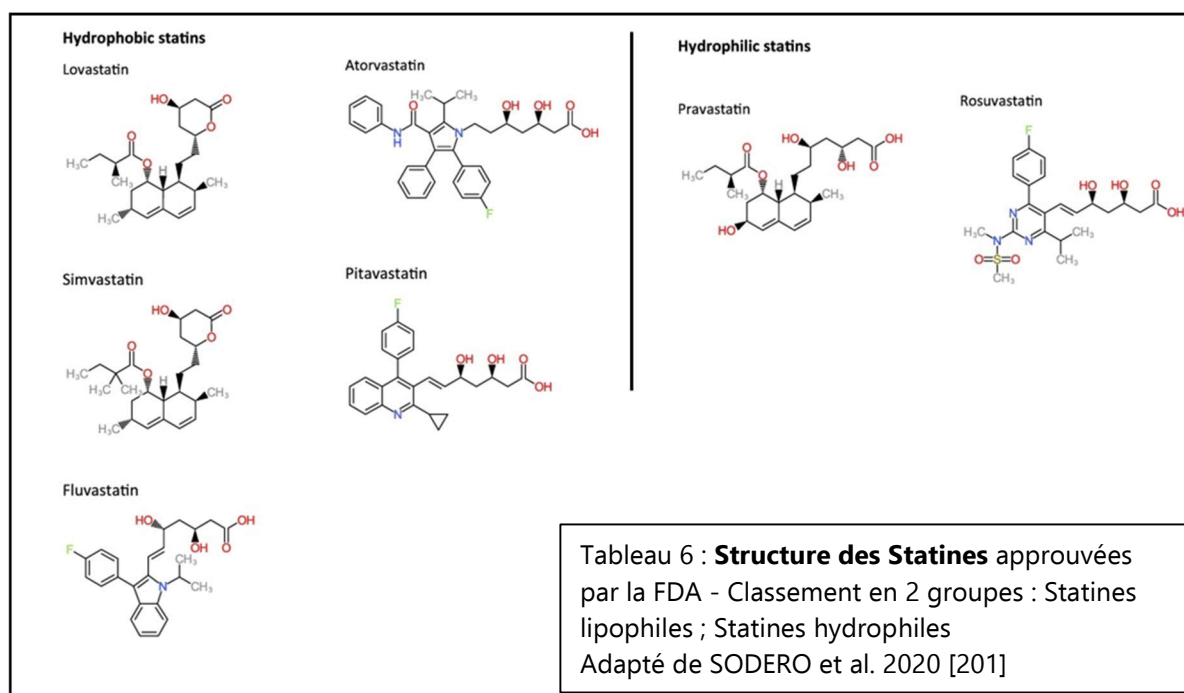
L'inhibiteur de cyclophiline le plus connu est la cyclosporine A, utilisée comme immunosuppresseur en cas de greffe mais qui ne peut pas être utilisée comme molécule antivirale. Une nouvelle famille de petites molécules non peptidiques inhibitrices des Cyps (SMCypI, « Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors »), développée récemment donne des résultats prometteurs [191]. Ces petites molécules ont une affinité forte pour les Cyps *in vitro* de l'ordre du nanomolaire. Elles n'ont pas de propriétés immunosuppressives et leur aptitude à inhiber la réplication de virus de familles différentes est montrée [185]. Elles sont issues d'une approche « Fragment-based drug design » (FBDD) combinant la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la cristallographie aux rayons X [192].

> Des antagonistes de TAM (**T**yro3, **A**xl, **M**ertk receptors) ciblant les étapes précoces de l'attachement du virus sur la cellule, sont actuellement en développement clinique. Ils pourraient être des anti-Flavivirus du fait de l'activité immunomodulatrice des récepteurs TAM lors des infections par les Flavivirus. Les récepteurs phospholipidiques TIM (**T**-cell **I**mmunoglobulin **M**ucin domain) et TAM ont un rôle immunomodulateur et montre un autre lien entre l'immunité et les lipides dans l'infection par les *Flavivirus* qui reste à comprendre et incitant à poursuivre dans cette voie pour identifier des antiviraux [193].

>Le **metformine** est une drogue qui augmente l'activité de la kinase AMP-dépendante (AMPK) adenosine-monophosphate activated kinase [194], comme l'**AICAR** et le **FP06409577** [195], entraînant l'inhibition de l'activité de HMGCR et donc la suppression de la biosynthèse du cholestérol. L'**acide nordihydroguaiaretic** (NDGA) inhibe la voie de signalisation (SREBPs) sterol regulatory element-binding proteins. Les SREBPs sont les principaux facteurs de transcription qui régulent la biosynthèse des lipides et l'homéostasie des lipides chez les mammifères. Le NDGA a un effet antiviral sur WNV (réduction de la réplication du WNV et de l'assemblage des particules) [196]. Ces molécules ont un effet inhibiteur à large spectre. Le **25-hydroxycholesterol** (25-HC) diminue la quantité de SREBP-1, un facteur de transcription activant les gènes de LDLr et HMGCR et inhibe l'infection à *Flavivirus* [85], et réduit la virémie du ZIKV. L'**ezetimibe** est un inhibiteur de l'adsorption du cholestérol approuvé comme traitement hypocholestérolémiants. Il pourrait avoir un effet antiviral sur les Flavivirus, d'autant qu'il est décrit pour avoir un effet antiviral sur HCV et HBV [197], [198]. Il est envisagé qu'une combinaison de drogues inhibant l'absorption et la synthèse du cholestérol pourrait avoir un effet antiviral plus efficace sur les *Flavivirus* [199].

Les travaux de Soto-Acosta (2018) et la revue de Martin-Acebes (2019) montrent et listent les pistes possibles et les inhibiteurs[194], [200]. Notamment, en relation avec le métabolisme des lipides dont la voie de synthèse des sphingomyélines. En présence d'une inhibition de la sphingomyéline synthase (SMS) par GSW4869, la réplication et la production du WNV est réduite.

>Les **statines** : la première, la mévastatine a été découverte et isolée en 1976. La lovastatine, son analogue est la première statine mise sur le marché en 1987. Sur les neuf statines identifiées, six ont été approuvées par la FDA pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Les statines sont des inhibiteurs spécifiques et compétitifs de la HMGCoA-réductase (Figure 16). Elles sont des analogues conformationnels du substrat, l'HMGCo-A et se lient au site actif de l'enzyme.



Les statines (Tableau 6) sont très largement utilisées comme médicaments hypocholestérolémiants. Ils inhibent la synthèse de l'acide mévalonique, un précurseur du cholestérol. L'acide mévalonique est également le précurseur de nombreux métabolites tels que le coenzyme Q (impliqué dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour la production d'ATP), les groupements farnésyl et géranylgeranyl, des isopentenyl tRNA (RNA transcription), du dolichol (impliqué dans la N-glycosylation des protéines). Les isoprénoïdes dont les stéroïdes (hormones stéroïdiennes, sels biliaires, vitamine D) sont des composés lipidiques ayant des fonctions dans la structure et les transports cellulaires. Pour cette raison, l'inhibition de HMGCoA-réductase a un effet pléiotrope sur les fonctions de plusieurs tissus et affecte plusieurs voies de signalisation (Figure 16).

Des effets tels que des propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires, antioxydantes, des effets cardioprotecteurs et anti-microbiens ainsi qu'un effet antiviral à large spectre, sont décrits. Les statines ont ainsi un effet préventif sur certains cancers et des effets antitumoraux [202], [203]. Les statines sont également associées dans des traitements de pathologies touchant le cerveau : les maladies d'Alzheimer et de Parkinson et certaines formes d'épilepsie. En effet, les produits de la voie MVA sont abondants dans le cerveau et importants pour le maintien d'un bon fonctionnement physiologique de celui-ci. Des perturbations dans le fonctionnement de la voie MVP sont associées à de nombreux dysfonctionnement du système nerveux. Dans sa revue, Fracassi et al. (2019) montre que la simvastatine et l'atorvastatine, deux statines lipophiles, passent la BHE murine avec beaucoup d'efficacité. La pravastatine et la rosuvastatine sont hydrophiles, il faut un transporteur pour assurer un transport actif vers le SNC [201].

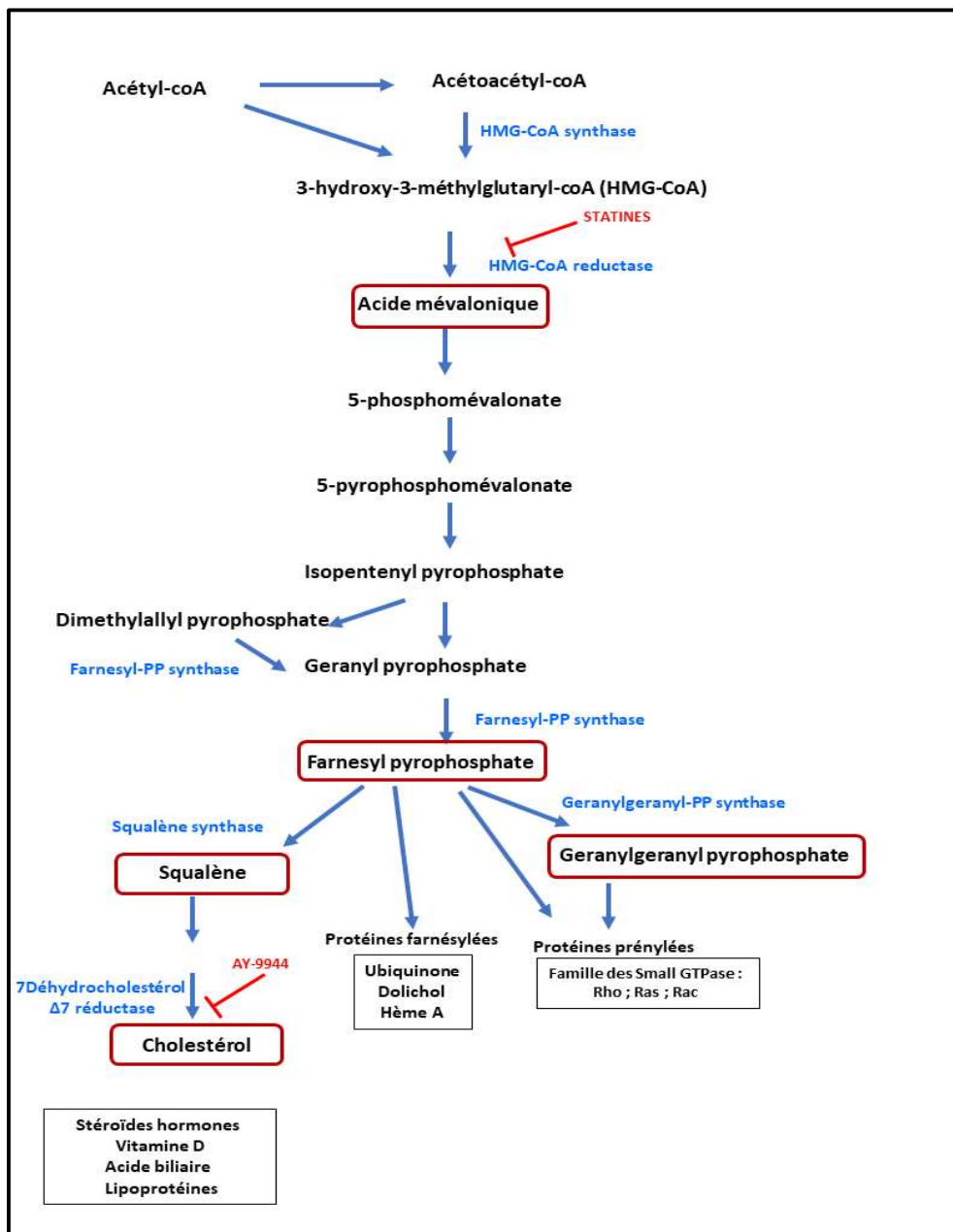


Figure 16 : schéma de la voie de synthèse de l'acide mévalonique ou mevalonate pathway (MVP) - Localisation des inhibiteurs

Il est montré que la synthèse de cholestérol au cours de l'infection, est indispensable pour la réplication du WNV et du DENV. La prénylation des protéines est un facteur tout aussi important [85]. L'impact du cholestérol sur les infections par WNV, YFV, ZIKV est étudié et permet de proposer les statines (médicaments) comme antiviraux à large spectre dirigés contre les *Flavivirus* [204]–[207]. Elles sont également présentées comme ayant un effet antiviral sur HCV, HIV et le BTV-8 [208]–[210].

II- Objectifs de ce travail de thèse

Nous assistons depuis ces dernières années à des épidémies et épizooties dues au virus West-Nile de plus grande ampleur pour lesquelles le nombre de cas d'infection notifiés pour l'Homme et l'équin est élevé, avec une extension de l'aire de distribution du virus en Europe. L'Europe a fait face à deux reprises à des saisons de transmission intenses du virus en 2018 et 2022 chez l'Homme et le cheval.

Compte tenu du risque sanitaire en santé humaine et équine, l'identification de traitements efficaces constitue désormais une priorité. La majorité des études se concentre sur la mise au point de modèles d'infection permettant de tester d'éventuels traitements efficaces chez l'Homme alors que peu de données sont disponibles pour l'équin.

Ma thèse s'inscrit dans une démarche d'anticipation et de prévention associée au concept « One Health » pour lequel la santé animale ne peut être dissociée de la santé humaine.

Nous avons décidé de nous concentrer sur l'infection du système nerveux équin et proposer des modèles d'études permettant d'identifier des thérapeutiques spécifiques capables de cibler le virus lui-même ou la cellule infectée, sans effet cytotoxique.

Mes objectifs de thèse ont été de :

- 1- Développer un modèle cellulaire 2D spécifique du SNC équin, basé sur l'utilisation d'iPSC équines (Induced Pluripotent Stem Cells),
- 2- Établir et caractériser un modèle d'infection par le virus West Nile à partir de ces cellules,
- 3- Cribler des molécules sélectionnées pour leur potentiel antiviral en utilisant les cellules neurales équines et de l'imagerie automatisée,
- 4- Détailler le mode d'action proviral des statines,
- 5- Mettre en place un modèle d'infection pour le virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV) afin de pouvoir évaluer le spectre d'action d'une molécule d'intérêt.

III- Matériel et méthodes

1. Les cellules

1.1. Les cellules neurales progénitrices humaines (hNPC)

Les hNPC sont cultivées comme cela est décrit dans l'article : **A novel equine iPSC-based phenotypic screening platform identifies pro- and anti-viral molecules against West Nile virus**

L'origine et l'obtention de ces cellules sont décrites dans les articles de Brnic D. et al. 2012 et Scordel C. et al. 2015 [211], [212]. Les cellules sont cultivées sous forme adhérente en monocouche sur une matrice Matrigel (BD Biosciences) recouvrant les supports (Coating au Matrigel 1/1000) en milieu de culture N2A, additionné de facteurs de croissance : epidermal growth factor EGF et basic fibroblast growth factor bFGF (Eurobio scientifique) à 20ng/mL [208]. Après repiquage, ces facteurs de croissances sont ajoutés deux fois dans la semaine. Le repiquage se fait quand les cellules atteignent 80% de confluence, c'est-à-dire une fois par semaine. Le TrypLe select1X (Gibco™) est alors utilisé comme agent de dissociation. Ces cellules sont classiquement cultivées en boîte de culture, 10 cm de diamètre (B10) (Falcon) coatées. Pour les différentes expériences, des plaques de culture noires 96 puits (P96) (Greiner Bio-One) sont utilisées. Les cellules sont mises en plaques coatées, la veille des expérimentations à raison de 40 000 cellules/puits en milieu N2A additionné de facteurs de croissances (FC).

1.2. Les cellules neurales progénitrices équine (eNPC) dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC)

Les cellules eNPC sont cultivées comme cela est décrit dans l'article : (Cochet *et al.* en préparation) Partie A des résultats. Leur obtention dans le cadre d'une collaboration avec X. Donadeu (The Roslin Institute, Edinburgh) et A. Benchoua (I-Stem, EVRY) est également décrite dans l'article. Ces cellules sont cultivées en milieu N2B27 supplémenté en facteurs de croissance : (EGF), (bFGF) (10ng/mL ; PEPROTECH) et BDNF (20ng/mL ; PEPROTECH). Les cellules sont repiquées une fois par semaine, après dissociation avec la trypsine-EDTA 0.05% (1X) (Gibco™) sur support coatés avec poly-L-Ornithine 1/6 (0,01% ; Sigma-Aldrich) puis Laminin 1/500 (1mg/mL ; Gibco™). Le repiquage pour l'entretien se fait en flasque 75 cm² (F75) (Falcon). Le milieu N2B27 est changé trois fois par semaine avec ajout des FC. Pour les différentes expérimentations : les eNPC sont mises en plaques la veille à raison de 40 000 cellules/puits, en P96 (Greiner Bio-One).

1.3. Les lignées cellulaires commerciales

1.3.1. Les lignées épithéliales Vero et A549

Les cellules Vero (E6) (ATCC-CRL-1586), une lignée de cellules épithéliales de rein d'un singe vert d'Afrique et les cellules A549 (ATCC-CCL-185), une lignée issue

d'un adénocarcinome pulmonaire humain sont également cultivées en milieu DMEM+GlutaMAX™ (Gibco™) supplémenté en sérum de veau foetal (SVF) (Eurobio) 10% final et Pénicilline-streptomycine (10 000 U/ml) (Gibco™) 100 UI/mL final.

1.3.2. Les conditions générales

Les différentes cellules sont comptées à l'aide du Compteur TC20™ Automated Cell Counter (Biorad).

Toutes les cultures sont maintenues à 37°C en atmosphère humide et 5% de CO₂.

2. Les virus

2.1 Le virus West Nile (WNV)

Le virus West Nile souche : New York 1999 (Genebank Accession : KC407666.1) a été utilisé pour l'ensemble des expérimentations. Le lot de virus a été amplifié sur cellules VERO (E6), le surnageant de culture a été collecté, centrifugé, aliquoté et conservé à -80°C.

Le virus est titré par la méthode des plages de lyse sur cellules VERO et le titre exprimé en PFU/mL (unité formant des plages de lyse/mL).

2.2. Le virus de l'encéphalite virale équine (EEEV)

Le EEEV a été produit dans l'équipe ZEN (UMR Virologie) selon la même méthode que le WNV. Le titre a été déterminé de la même façon. Il s'agit de la souche : NCPV689, souche H178/99 ; ICTV 0407041 (99.8 % ID avec KX000089.1 souche CV).

2.3. L'amplification du WNV

Une flasque 75 cm² de cellules VERO, ensemencées la veille, à 70% de confluence lors de l'infection a été infectée avec 2mL d'une suspension virale en DMEM+GlutaMAX™ (Gibco™) et Pénicilline-streptomycine (100 UI /mL) sans sérum pour une MOI de 10⁻². Après 2 heures d'adsorption à 37°C, en atmosphère humide à 5% de CO₂, du milieu supplémenté en SVF 2% final préchauffé à 37°C est déposé dans le flasque pour un volume final de 9mL. Le flasque est remis en incubation à 37°C pendant trois jours et le surnageant est récupéré.

2.4. Les titrations du virus West Nile

Les VERO (E6) sont utilisées pour le titrage :

- du stock viral par la méthode des plages de lyse.
- des particules virales infectieuses présentes dans les surnageants de cultures des expérimentations réalisées, selon la méthode de TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose).

Lors des différentes expérimentations avec infection, les différentes lignées cellulaires sont cultivées en milieu à 2% de SVF.

Les inocula sont en milieu de culture sans sérum.

Avant infection et dépôt d'un inoculum ou lors des repiquages, avant dépôt du tampon de dissociation, les tapis cellulaires sont rincés au DPBS (-/-) (Gibco™).

2.4.1. Par la méthode des plages de lyse

Le virus West Nile est titré par la méthode des plages de lyse sur cellules VERO. Le titre est exprimé en PFU/mL. Des dilutions successives de 10 en 10 du stock viral, en milieu sans sérum sont réalisées. Chaque dilution est déposée en double dans les puits de plaque 12 puits (P12) (Falcon). Après une heure d'adsorption, l'inoculum est éliminé et remplacé par 2mL de milieu à 1.2% d'Avicel et 2% de SVF. Après trois jours d'incubation, le milieu est retiré et les cellules lavées au PBS1x avant d'être fixées pendant 30 min par une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA 4%). La coloration des tapis cellulaires est ensuite effectuée en utilisant du Cristal violet 0,2% en PBS1X. Après rinçage au PBS1X (Gibco™), les plages de lyse sont comptées. Le nombre de PFU/mL est calculé en tenant compte du volume d'inoculum et de la dilution. Le dénombrement des plages se fait pour la dernière dilution ayant au minimum 10 plages. La formule de calcul est : $T = (X/V) \times D$ exprimé en PFU/mL

T = Titre ; X moyenne des plages comptées sur les 2 puits d'une même dilution D ; V = volume d'inoculum déposé dans le puits en mL.

2.4.2. Par TCID50 (50%Tissue Culture Infectious Dose)

Les échantillons sont titrés sur VERO, en P96, après dilutions successives de 10 en 10 en milieu sans sérum (de 10^{-1} à 10^{-8}). Chaque dilution est déposée en répliquats sur les cellules,ensemencées la veille. Après 2 heures d'adsorption à 37°C, du milieu à 2 % de SVF est ajouté. Les lectures sont faites 3 jours post-infection. Pour chaque dilution et échantillon, le nombre des puits avec effet cytopathique (ECP) est comptabilisé.

Les titres, exprimés en TCID50/mL sont déterminés à l'aide de la méthode de calcul de Reed–Muench [213].

2.5. La cinétique d'infection des eNPC par le virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV)

Pour déterminer les conditions d'infection en vue d'établir un modèle d'infection pour l'*Alphavirus* (EEEV), des cinétiques d'infection avec des doses variables de virus et deux temps d'incubation ont été réalisées.

Une gamme décroissante de MOI 1 à 10^{-6} a été testée lors de cinétique d'infection des eNPC. Chaque point de la gamme a été testé en six répliquats sur eNPC en puits de microplaques 96 puits (P96). Pour l'infection, 40 µL/puits d'inoculum sont déposés et incubés à 37°C sous agitation douce pendant 1h30. A l'issue de l'adsorption, l'inoculum est éliminé et 150 µL de milieu frais/puits sont déposés.

Les tapis cellulaires sont fixés à deux temps : 22h PI et 46h PI au PFA4 % 30 min puis rincés 3 fois au PBS1X. Avant fixation des cellules, les surnageants de culture sont récupérés, aliquotés et conservés à -80°C.

3. Les molécules utilisées

3.1. Les molécules antivirales et la banque « MolPort »

Les quarante-cinq molécules présentées dans l'article en préparation (Cochet et al.) (Tableau 1) sont des produits Millipore, Sigma-Aldrich ou TargetMol. Une majorité entre dans une banque constituée pour un projet SAVE (Stratégies AntiVirales Equines) visant à identifier des molécules antivirales actives sur l'herpèsvirus équin 1, le virus de l'artérite virale équine et le virus West Nile.

En tenant compte des recommandations des fournisseurs, les molécules ont été mises en suspension en 100 % DMSO (sigma-Aldrich) ou en eau et aux concentrations conseillées.

3.2. L'inhibiteur de la voie de synthèse du mévalonate

La molécule AY-9944 (sigma-Aldrich) a été reprise en 100 % DMSO en suivant les indications du fournisseur. Son action sur la voie de synthèse est décrite dans la figure 16.

4. Criblage de molécules antivirales

Les molécules antivirales (voir dans l'article en préparation (Cochet et al.) le tableau 1) ainsi que le AY-9944, un inhibiteur de la voie de synthèse de l'acide mévalonique ont été diluées à différentes concentrations par la méthode des dilutions successives en N2B27 + 0,2% DMSO. Les concentrations finales de 1, 10 ou 100 μM ont principalement été testées pour les molécules antivirales. Les molécules sont testées en milieu N2B27 + 0,2% DMSO sur les cellules pour tenir compte de l'ajout de DMSO lorsque les molécules ont été reprises en DMSO. Chaque concentration a été testée sur eNPC infectées par WNV en 4 répliquats. Sur chaque plaque de criblage, des contrôles ont été ajoutés (8 répliquats de chaque). Il s'agit de : ^{1/} cellules non infectées (NI) et ^{2/} cellules infectées par WNV MOI 10^{-1} sans molécule (Contrôle).

Les cellules ont été prétraitées avec 40 μL d'une solution de milieu contenant les molécules diluées pendant 2h. Puis, 4 μL de suspension WNV ont été ajoutés dans chaque puits, correspondant à une MOI finale de 10^{-1} . L'inoculum a été retiré après 2h d'incubation et 150 μL de chaque composé ont été ajoutés dans chaque puits (les composés ont été testés en quatre répliquats). 48h post infection, les surnageants ont été collectés et conservés à -80°C , les tapis cellulaires ont été fixés au PFA 4 % pendant 20 minutes à température ambiante puis rincés au PBS1X. Les plaques ont été conservées à 4°C en vue d'un immunomarquage pour une quantification de l'infection en imagerie cellulaire.

5. Calcul de CC50, IC50 et IS

Pour les molécules présentant un effet antiviral sur eNPC, la concentration inhibitrice médiane (concentration inhibant de 50 % l'infection/contrôle infection sans molécule) (IC50), la concentration cytotoxique médiane (concentration cytotoxique

pour 50% de cellules/contrôle infection sans molécule) (CC50) et l'Index de Sélectivité $IS=CC50/IC50$ ont été déterminés.

Les molécules ont été diluées par la méthode des dilutions successives sur une gamme étendue variable en fonction des molécules. Les expérimentations ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les criblages

6. Expérience de cycle unique de réplication (One step growth cycle)

Pour établir le profil du cycle viral du WNV sur les eNPC, les cellules ont été infectées, après retrait du milieu, à une MOI de 2 sur une plaque P96 classique (Falcon) préparée la veille. Après 2h d'adsorption, sous agitation douce et à 37°C, l'inoculum a été retiré et après un rinçage, avec du milieu, 100 µL de milieu (N2B27+FC) ont été déposés dans les puits. La plaque a ensuite été remise en incubation.

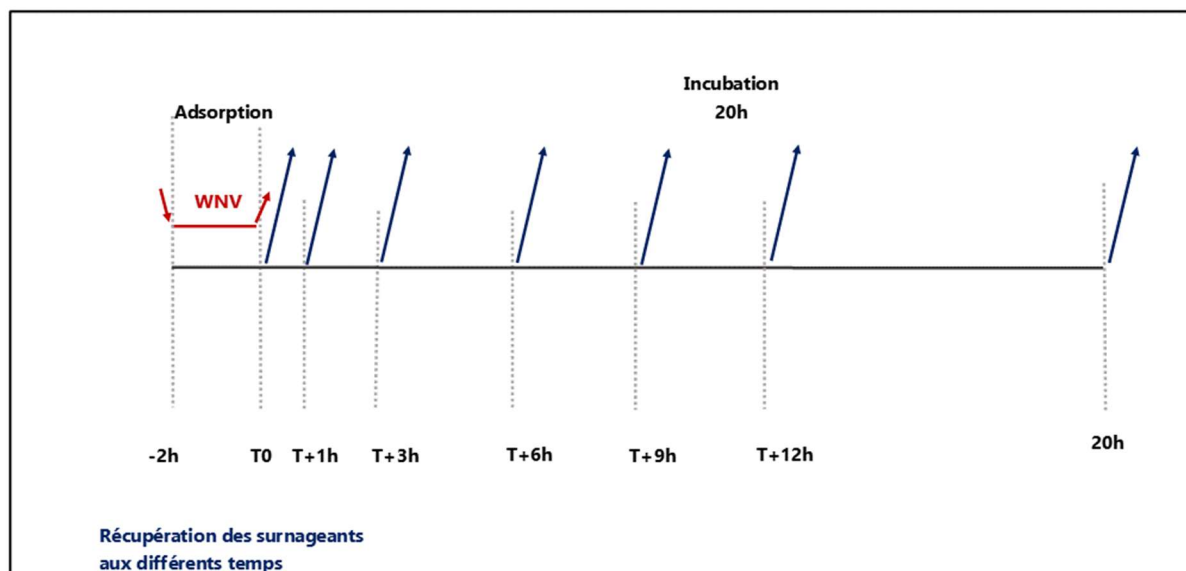


Figure 17 : **One step growth cycle**

Témoins NI : non infecté. 6 reliquats par condition temps T.

Indications : Phase d'adsorption du WNV à MOI2 - Différents temps de prélèvement des surnageants.

A différents temps préalablement définis : T0, T+1h, T+3h, T+6h, T+9h T+12h et T+20h (Figure 17), les surnageants ont été collectés et conservés à -80°C pour une analyse en TCID50 et RT-qPCR, pour respectivement quantifier les particules virales infectieuses et les ARN viraux. Cette expérience a été réalisée 2 fois.

7. Expérience d'ajout d'une statine à différents temps (Time of drug addition assay (TOA))

7.1. TOA (48h)

Un premier TOA dit court a été réalisé sur eNPC et hNPC infectées par le WNV à une MOI de 10^{-1} . La Figure 18 représente le schéma expérimental.

Nous sommes partis de la condition Continu. A savoir : un prétraitement de 2h, une adsorption du WNV de 2h puis une incubation de 48h pour les eNPC et 72h pour les hNPC. Nous avons établi 4 conditions et les témoins : cellules non infectées (NI) et contrôle : cellules infectées sans ajout de molécules (Control).

- 1 Continu : qui correspond à la condition classique de criblage.
- 2 Prétraitement : la statine est ajoutée uniquement pendant la phase de prétraitement.
- 3 Adsorption : la statine est ajoutée pendant la phase d'adsorption du virus.
- 4 Post-adsorption : la statine est ajoutée uniquement pendant la phase d'incubation.

Les statines atorvastatine (ATO) et fluvastatine (FLU) (reprise en DMSO (Sigma)) sont diluées dans le milieu de culture spécifique à chaque cellule, à $1\mu\text{M}$ pour les expériences sur les eNPC et $10\mu\text{M}$ sur les hNPC.

Pour ces expériences, le milieu de culture est additionné en DMSO à 0.2% final, pour placer chaque condition et les contrôles dans des conditions similaires de milieu.

Pour chaque condition, après adsorption, l'inoculum ($44\mu\text{L}$ /puits) est retiré. Le tapis cellulaire est rincé une fois avec du milieu avant ajout de milieu frais ($150\mu\text{L}$), préchauffé avec ou sans statine en fonction de la condition.

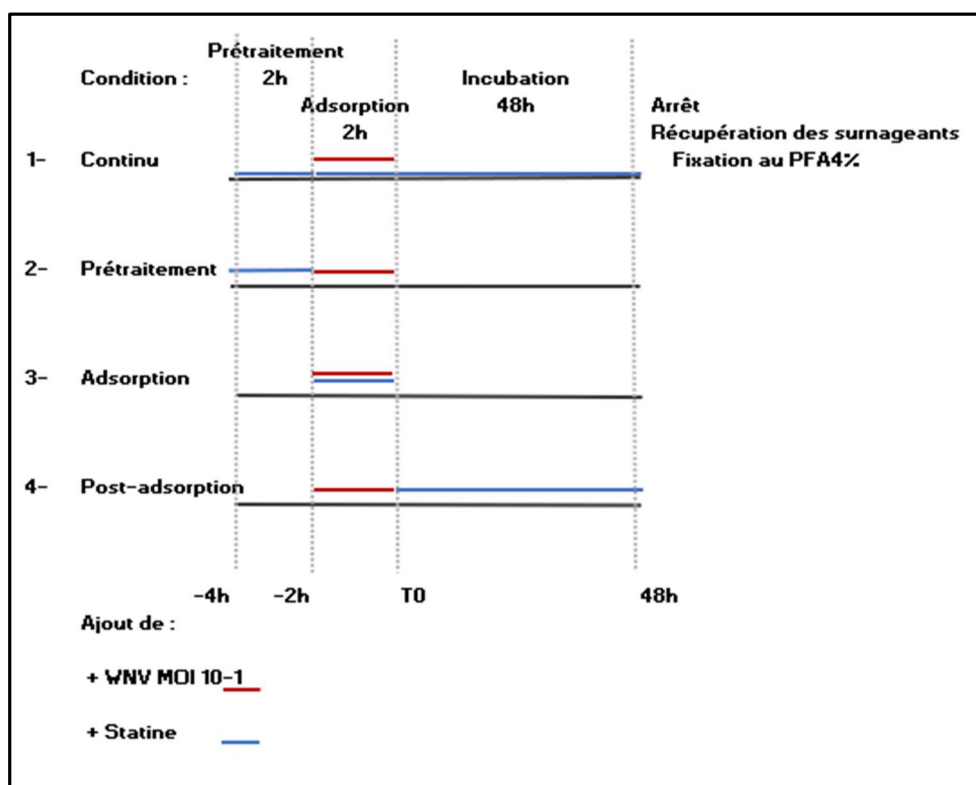


Figure 18 : **Schéma expérimental du TOA (48h).**

4 conditions et 2 témoins NI : non infecté et contrôle : infection en absence de molécule.
1- Continu ; 2- Prétraitement ; 3- Adsorption ; 4- Post-adsorption.

Quarante-huit ou soixante-douze heures post infection respectivement pour les eNPC et les hNPC, les surnageants sont collectés et conservés à -80°C. Les ARN viraux et les particules virales infectieuses présents dans ces surnageants seront quantifiés respectivement par RT-qPCR et TCID50. Les tapis sont fixés au Paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) (Electron Microscopy Sciences) puis rincées trois fois au PBS1X. Les plaques sont conservées à 4°C avant marquage.

7.2. TOA (20h)

Pour déterminer, à quelle étape du cycle viral, la statine exerce son effet pro ou antiviral, nous avons ajouté une statine, ATO ou FLU à 1 μ M sur les eNPC et ATO 10 μ M sur les hNPC, à différents temps post infection et maintenue jusqu'à la fin de l'incubation, soit vingt heures. Les molécules sont diluées à la concentration choisie dans le milieu de culture spécifique aux cellules en présence de FC et additionnées de DMSO au 1/500^e.

Sur des cellules repiquées la veille, après retrait du milieu, l'inoculum WNV est déposé à raison de 40 μ L MOI 1. A l'issue d'une adsorption de 2h, sous agitation douce (balancelle) à 37°C en atmosphère humide et 5% de CO₂, l'inoculum est retiré et du milieu frais (150 μ L/puits), préchauffé à 37°C est ajouté. La statine est ajoutée dans les puits, en fonction du temps d'ajout choisi : T0, T+1h, T+3h, T+6h, T+9h et T+12h, (Figure 19) sous forme d'un petit volume (4 μ L) et homogénéisé puis, les plaques sont remises en incubation.

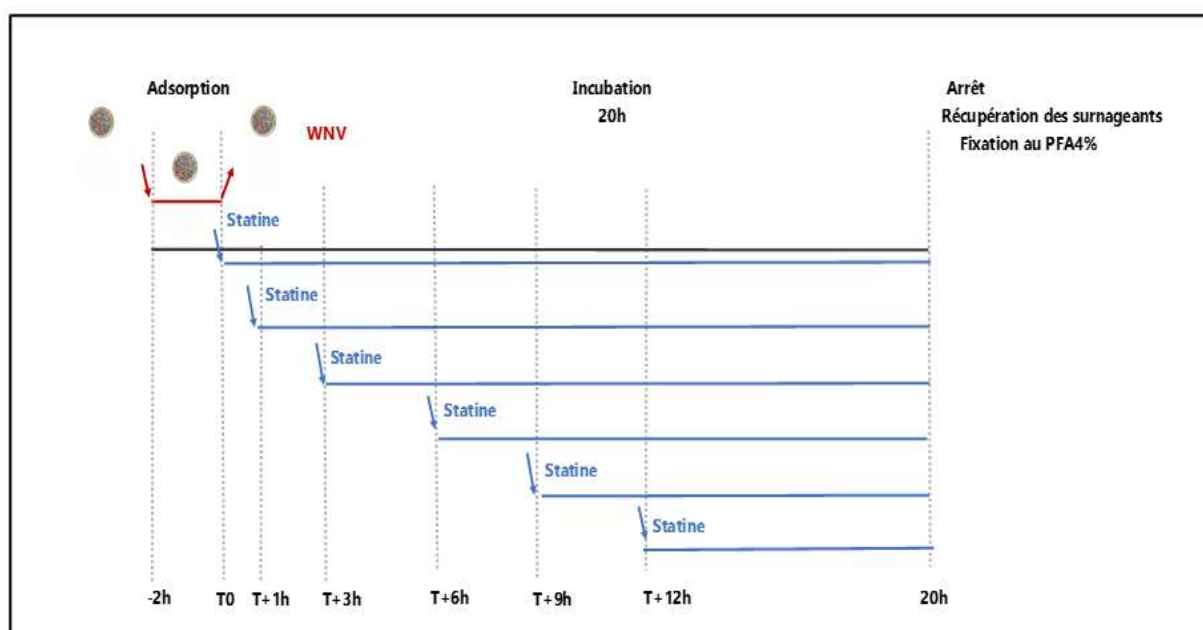


Figure 19 : **Schéma expérimental du TOA (20h)**. Témoins NI : non infecté et contrôle : infection sans ajout de molécule. Ajout de statine à T0, T+1h, T+3h, T+6h, T+9h, T+12h. 6 reliquats par condition.

L'expérience est arrêtée 20h post infection. Comme pour les autres expériences, les surnageants sont conservés et les plaques sont fixées au PFA 4% avant marquage pour une analyse en imagerie.

8. Inhibition de la voie de synthèse de l'acide mévalonique

Des expériences en présence d'un inhibiteur de la voie de synthèse du mévalonate : le AY-9944, agissant sur la dernière enzyme de la branche de la synthèse du cholestérol (Figure 16) ont été réalisées. ATO a été choisi comme contrôle : effet proviral sur eNPC et effet antiviral sur hNPC. Les autres paramètres de la condition Continu (1) présentés figure 18 ont été conservés.

Nous avons réalisé un effet/dose en ajoutant post infection, AY-9944 à différentes concentrations (gamme de 10 à 0,001 μ M). Les dilutions successives sont réalisées à la concentration choisie dans le milieu de culture spécifique aux cellules en N2B27 pour les eNPC et N2A pour les hNPC en présence de FC et de DMSO à 0.2% final.

9. Analyse par microscopie

9.1. Immunomarquage indirecte

Sur chaque P96, un immunomarquage indirect a été réalisé. Les tapis ont été perméabilisés et bloqués en PBS1X ; 0,3 % Triton X-100 ; 3 % d'albumine de sérum bovin (BSA ; Sigma-Aldrich) pendant 2 heures à température ambiante (RT). Pour le marquage des cellules infectées, un sérum de lapin immunisé (WNV-E3 1/1000) (produit par Cécile BECK-Equipe ZEN-UMR1161) dirigé contre le domaine III de la protéine d'enveloppe du WNV a été dilué au 1/1000^e en 0,1 % de PBS1X ; 0,1 % Triton X-100 ; 0,3 % BSA pendant une nuit à 4°C. Les puits ont été lavés 3 fois avec du PBS et incubés pendant 2 heures à température ambiante avec un anticorps anti-rabbit Alexa Fluor 546 (1/1000^e ; Invitrogen™). Les noyaux ont été colorés simultanément avec du 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI ; 0,1 μ g/mL ; Sigma-Aldrich). Les cellules ont ensuite été rincées 3 fois avec du PBS1X.

9.2. Analyse en imagerie cellulaire automatisée

Des images à deux canaux ont été acquises de manière entièrement automatisée à l'aide d'un microscope confocal à disque tournant (Opera Phenix™ Content Screening System, PerkinElmer Technologies) doté d'un objectif à air 10x (NA = 0,3). Les paramètres d'acquisition séquentiels suivants ont été déterminés à l'aide du logiciel Harmony4.9 pilotant l'automate : ^{1/} une excitation de la ligne laser 561 nm, filtre 599 pour la détection du marquage spécifique de l'infection et ^{2/} une excitation de la ligne laser 375 nm, filtre 456 pour la détection du marquage DAPI. Douze images par canal et par puits ont été collectées pour une analyse statistique fiable tenant compte de la distribution potentielle des cellules. Les images ont été transférées dans la base de données Columbus Conductor™ (Perkin Elmer Technologies) pour stockage et analyse ultérieure.

10. Biologie moléculaire

Ce paragraphe concerne uniquement WNV. L'extraction et la quantification des ARN viraux de EEEV n'ont pas été réalisées.

10.1. Extraction des ARN viraux

Les ARN viraux sont extraits des surnageants de culture à l'aide du kit QIAGEN : QIAmp Viral RNA Mini Kit, selon le protocole d'extraction sur colonne établi par le fournisseur.

10.2. Reverse Transcriptase RT

Le kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™) a été utilisé pour amplifier des cDNA à partir des ARN viraux, selon le protocole déterminé par le fournisseur.

10.3. qPCR

Le Kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN) a été utilisé selon les indications du fournisseur pour réaliser les PCR en temps réel et quantifier à partir des cDNA, les ARN viraux présents dans les surnageants de culture. Les réactions ont été réalisées sur un LightCycler® 96 (ROCHE) avec les conditions suivantes : 15 min à 94°C pour activer l'enzyme, puis 40 cycles d'amplification avec la répétition de la séquence suivante : 95°C pendant 30 s, 60°C pendant 30 s, et 72°C pendant 30 s, à l'issue des 40 cycles, une dernière amplification de 10 min à 72°C est ajoutée. Les amorces spécifiques de WNV utilisées sont : WNProC-F 10, 5'- CCT GTG TGA GCT GAC AAA CTT AGT -3' et WNProC-R 153 5'- GCG TTT TAG CAT ATT GAC AGC C -3'.

11. Statistiques

Les résultats de quantification de l'infection par imagerie, TCID50 et RT-qPCR ont été exprimés en moyenne (+/-) écart-type.

L'analyse statistique a été faite par la méthode de Mann Whitney à l'aide du logiciel GraphPad PRISM 9.2.0.

Les CC50, IC50 et IS des molécules intéressantes ont été calculés à l'aide du package R "drc" (version 3.0.1) [214].

IV- Résultats

1. Développement d'un crible phénotypique basé sur l'utilisation de cellules progénitrices neurales équine et identification de molécules pro- et anti-virales contre le virus West Nile

Ces dernières années, de nombreuses études ont visé à identifier des molécules antivirales mais pour beaucoup, des modèles cellulaires peu pertinents physiologiquement (lignées cellulaires) ont été utilisés. Des études montrent que dans les modèles cellulaires *in vitro*, l'espèce et le type cellulaire, peuvent influencer les résultats et donc induire un biais orientant sur une fausse piste [178]. Les résultats obtenus peuvent ainsi, ne pas être transposables aux cellules du système nerveux des chevaux.

Aussi, pour être en mesure d'identifier des molécules présentant un potentiel antiviral dans le système nerveux des équidés, notre premier objectif a été de développer un modèle d'infection par WNV basé sur des cellules neurales équines dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs).

Article : “ A novel equine iPSC-based phenotypic screening platform identifies pro- and anti-viral molecules against West Nile virus ” (en cours de soumission)

5 Cochet M¹, Piumi F¹, Gorna K¹, Berry N¹, Gonzalez G¹, Danckaert A², Aulner N², Blanchet O³, Zientara
6 S¹, Donadeu FX⁴, Munier-Lehmann H⁵, Richardson J¹, Benchoua A⁶, Couplier M^{1*}

7
8 Affiliations :

9 ¹UMR 1161 Virologie (INRAE, ANSES, ENVA), Maisons-Alfort, France

10 ²Institut Pasteur Paris, UTechS-PBI / Imagopole, France

11 ³Centre de Ressources Biologiques, BB-0033-00038, CHU Angers, Angers, France.

12 ⁴Division of Developmental Biology, Roslin Institute, of Edinburgh, Edinburgh, UK.

13 ⁵Plateforme de Criblage Chémogénomique et Biologique (PF-CCB), Institut Pasteur, Paris, France.

14 ⁶CECS, I-STEM, AFM, Evry, France.

15 *Corresponding author: muriel.couplier@vet-alfort.fr

16 17 **ABSTRACT**

18 Outbreaks of West Nile virus continually occur, affecting both human and equine populations. There
19 are no vaccines for humans, and whereas vaccines are commercialised for horses, they do not have
20 sufficient coverage. Specific antiviral treatments do not exist. Many studies aimed at drug discovery
21 are performed, but as they use either rodent or primate cell lines, their results may not always be
22 transposed to horses. There is thus a need to develop relevant cellular models of equine origin. Here,
23 we used induced pluripotent stem cells to develop a new *in vitro* model of West Nile virus-infected
24 equine brain cells suitable for microplate assay and assessed the cytotoxicity and antiviral activity of
25 forty-one chemical compounds. We found that one nucleoside analog, 2'C-methylcytidine, blocked
26 West Nile virus infection in equine brain cells, whereas another, sofosbuvir, was ineffective despite its
27 display of WNV activity in human cell lines. We also revealed an unexpected proviral effect of statins
28 in West Nile virus-infected equine brain cells. Our results thus identify a potential lead for future drug
29 development and underscore the importance of using a tissue and species relevant cellular model for
30 assessing the antiviral activity of compounds in equines.

INTRODUCTION

West Nile virus (WNV) is a neurotropic mosquito-borne flavivirus belonging to the *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family. It infects many species, including humans and equids in which it is usually asymptomatic or causes mild flu-like symptoms. In some cases, however, infection leads to neuroinvasive diseases such as meningitis, encephalitis or poliomyelitis that can be fatal for both humans and horse (1). In the last decades, WNV has continued to expand geographically and has become endemic in many countries, leading to an increase in the number of West Nile neuroinvasive disease (WNND) cases (Eurosurveillance, <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-virus-infection>). Although three vaccines are available for horses (2), their coverage is insufficient and outbreaks regularly occur (3, 4). Specific antiviral drugs are not available and existing treatments are merely supportive.

Investigation of antiviral compounds has allowed the identification of both direct-acting and host-directed antivirals (DAA and HAD, respectively), with the most promising agents highlighted in recent reviews (5, 6). DAA mostly target the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of the viral nonstructural protein 5 (NS5), acting through blockage of genome replication. HDA include virus entry, nucleoside biosynthesis and cyclophilin inhibitors as well as compounds targeting proteins associated with the ER or lipid metabolism and anti-parkinsonism drugs, thus targeting the viral cycle at different stages. The latter would in principle have less tendency to induce selection of drug-resistant viruses. They may also provide a broader spectrum of activity, as host factors may be co-opted by different viruses, though broad-spectrum activity (BSA) has also been evidenced for nucleoside analogs, as RdRps are highly conserved amongst RNA viruses.

The antiviral activity of DAA and HDA compounds has generally been demonstrated using cell lines of rodent or primate origin. These models, however, maybe poorly predictive of therapeutic efficacy in primary cells and in equine species. Equine cell lines, such as equine dermal cells (ED) have been used to test antivirals against equine arteritis virus (7) and equine herpes virus (8) but they are of little use to WNV researchers as they are weakly permissive to WNV and not specific to the brain, its main target. In humans, the study of viral brain infection has recently benefited from the development of brain cell models derived from either induced pluripotent cells (iPSCs) (9, 10) or fetal neural progenitor cells (NPCs) (11–13). The advent of iPSC technology has also recently provided new venues for modelling equine disease (14, 15) and brain cells susceptible to WNV have recently been generated from equine iPSCs (15). This last study, however, has not so far been independently reproduced and, unlike in humans (10), the use of equine iPSC-derived cells for assessing antiviral potential has not been reported.

In this study, our aim was to develop an *in vitro* model of WNV infection based on equine brain cells in order to identify therapeutic candidates with antiviral activity in horses. Out of 41 chemical compounds tested, one displayed activity against WNV, whereas others were either inactive or exhibited, surprisingly, pro-viral activity.

77 MATERIAL AND METHODS

78 Ethics statement

79 Human fetus was obtained after legal abortion with written informed consent from the patient. The
80 procedure for the procurement and use of human fetal central nervous system tissue was approved
81 and monitored by the "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche
82 Biomédicale" of Henri Mondor Hospital, France. Authorization and declaration numbers at the
83 Research Ministry are AC-2017-2993 (CHU Angers) and DC-2019-3771 (UMR Virology). The rabbit
84 immunization protocol complied with EU legislation (authorization 12/04/11-6 accorded by the
85 ANSES/ENVA/UPEC ethical committee).

86

87 Cell culture

88 VERO (ATCC No. CRL-1586) and A549 (ATCC No. CCL-185) cells were cultured in Minimum Essential
89 Medium (MEM, TFS, Fr) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, TFS, Fr). Human neural
90 progenitor cells (hNPCs) were prepared and cultured as previously described in (16). Equine iPSCs
91 (eIPSCs) were cultivated feeder-free using a matrix of truncated vitronectin (Vitro-N, Gibco, TFS, Fr) in
92 a medium composed of StemMACS iPS-Brew (Miltenyi Biotech, Germany) supplemented with mouse
93 LIF (1000 U/ml, Merck Millipore). Neural induction and collection, amplification and banking of eNPCs
94 were achieved as described in (17). Equine NPCs were maintained on poly-ornithin/laminin coated
95 dishes in N2B27-GF medium. N2B27-GF: DMEM-F12 with GlutaMAX: Neurobasal (1:1) plus N2, B27
96 without vitamin A and 0.55 mM 2-mercaptoethanol (TFS, Fr) supplemented with EGF, bFGF and BDNF
97 (10, 10 and 20 ng/ml, respectively, PeproTech). Neuronal differentiation of eNPCs (from passage 3 to
98 10) was induced by EGF and bFGF withdrawal 24h after plating (125,000 cells/cm² in 96-well plates,
99 Greiner Bio-One). Medium was changed three times a week. All cells were maintained at 37°C, 5% CO₂,
100 TFS, Thermo Fisher Scientific, Fr, France.

101

102 Virus and infection

103 A stock of WNV_{NV99} strain (Genebank Accession No. KC407666.1) was generated in VERO cells,
104 aliquoted and stored at -80°C until use. Titer was estimated by plaque assay as described in (18). Cells
105 were infected at the indicated MOI for 2h at 37°C before removal of the inoculum and replacement by
106 fresh medium containing or not chemical compounds until collection of supernatants at the indicated
107 time. Virus titers in supernatants were estimated by endpoint dilution (TCID₅₀) as described in (12)
108 Reed and Muench (19). All procedures were performed under bio-safety level-3 (BSL-3) conditions.

109

110 Compound library and screening assay

111 Forty-one chemical compounds (listed in Supplementary Table 1; partly described in (19) and
112 cyclophilin inhibitors described in (20) were reconstituted at 10 mM in dimethylsulfoxide (DMSO,
113 Sigma) or water. Fluvastatin, simvastatin and lovastatin (Sigma, SML0038, S6196, 438185,
114 respectively) were reconstituted in DMSO. They were diluted to the indicated concentration in N2B27-
115 GF containing 0.2% DMSO. Non-infected and WNV-infected eNPCs were used as negative and positive
116 controls, respectively and maintained in N2B27-GF plus 0.2% DMSO. Cells were pre-treated for 2h with
117 the compounds before WNV infection as described above (MOI 10⁻², 48h). Supernatants were then
118 collected and cells fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science) for analyses.

119

120 Immunofluorescence assays

121 Standard immunofluorescence was performed as described in (12). Primary antibodies were against
122 β III-Tubulin (T8660-Sigma or Ab18207-Abcam), HuC/D (A-21271-TFS), GFAP (Z0304-DAKO), SOX2
123 (AB5603-Millipore), and the domain 3 of WNV envelop (WNV-E3). Secondary antibodies were Alexa
124 Fluor 488/546 anti-rabbit/anti-mouse (TFS, Fr). Nuclei were stained with 0.1 ng/ml 4,6-diamidino-2-
125 phenylindole (DAPI, Sigma).

126

127

128

129 **Image acquisition and analysis**
 130 Two channel images were acquired in a fully automated and unbiased manner using the Opera
 131 Phenix™ Content Screening System (PET) and a 10x air objective (NA = 0.3). Twelve images per channel
 132 were collected, transferred to the Columbus Conductor™ Database and analyzed with the Harmony
 133 software (PET). Approximately 32000 cells were counted per well. PET, Perkin Elmer Technologies
 134

135 **Determination of the selectivity index**
 136 The experimental design described above for the screening assay was used to determine the
 137 IC50/CC50 (half maximal inhibitory/cytotoxicity concentration) and SI (selectivity index) of the
 138 compounds considered to be hits. Compounds were tested from 0.05 to 150 µM (ribavirin), 0.2 to 390
 139 µM (2'-CMC) and 0.15 to 78 µM (arbidol).
 140

141 **RNA isolation and real time PCR**
 142 Procedures were as described in (12). Primers used were WNV-F, 5'- CCT GTG TGA GCT GAC AAA CTT
 143 AGT -3' and WNV-R, 5'- GCG TTT TAG CAT ATT GAC AGC C -3'.
 144

145 **Statistical Analyses**
 146 Data are represented as the mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed with
 147 GraphPad Prism V9.2.0. using a two-tailed unpaired Mann Whitney test * = (p < 0.05), ** = (p < 0.01),
 148 *** = (p < 0.001), non-significant (ns) = (p > 0.05). CC50, IC50 and SI analyses were performed with the
 149 R package "drc" (version 3.0.1) (21).
 150
 151
 152
 153

155 RESULTS

156 Derivation of brain cells from equine induced pluripotent stem cells (eiPSCs)

157 Equine iPSCs generated previously (14) were differentiated into the neural lineage, as shown in Fig.
 158 1A. First, they were cultivated in conditions allowing self-renewal and formation of compact and
 159 homogeneous colonies expressing the pluripotency marker Oct4 (Fig. 1B). Then, neural induction was
 160 initiated leading to a stable population of cycling eNPCs that homogenously expressed, after two
 161 passages, the neural nuclear marker SOX-2 (Fig. 1C). From passages 4 to 10, eNPCs were induced to
 162 differentiate for 2, 7 and 14 days. Immunostaining with antibodies directed against two neuronal
 163 markers, β III-Tubulin and huC/D, revealed an increased number of neurons over time (Fig. 1D). At 14
 164 days of differentiation, double immunostaining for SOX-2 and β III-Tubulin showed the presence of
 165 numerous progenitor cells (SOX-2 positive) in the vicinity of young neurons (SOX-2/ β III-Tubulin-
 166 positive) (Fig. 1E). No glial cells were detected upon immunostaining against GFAP, an astrocyte
 167 marker, and OLIG-2, an oligodendrocyte marker (not shown). Of note, many floating cells were
 168 observed in the supernatant, revealing cellular death at this stage.

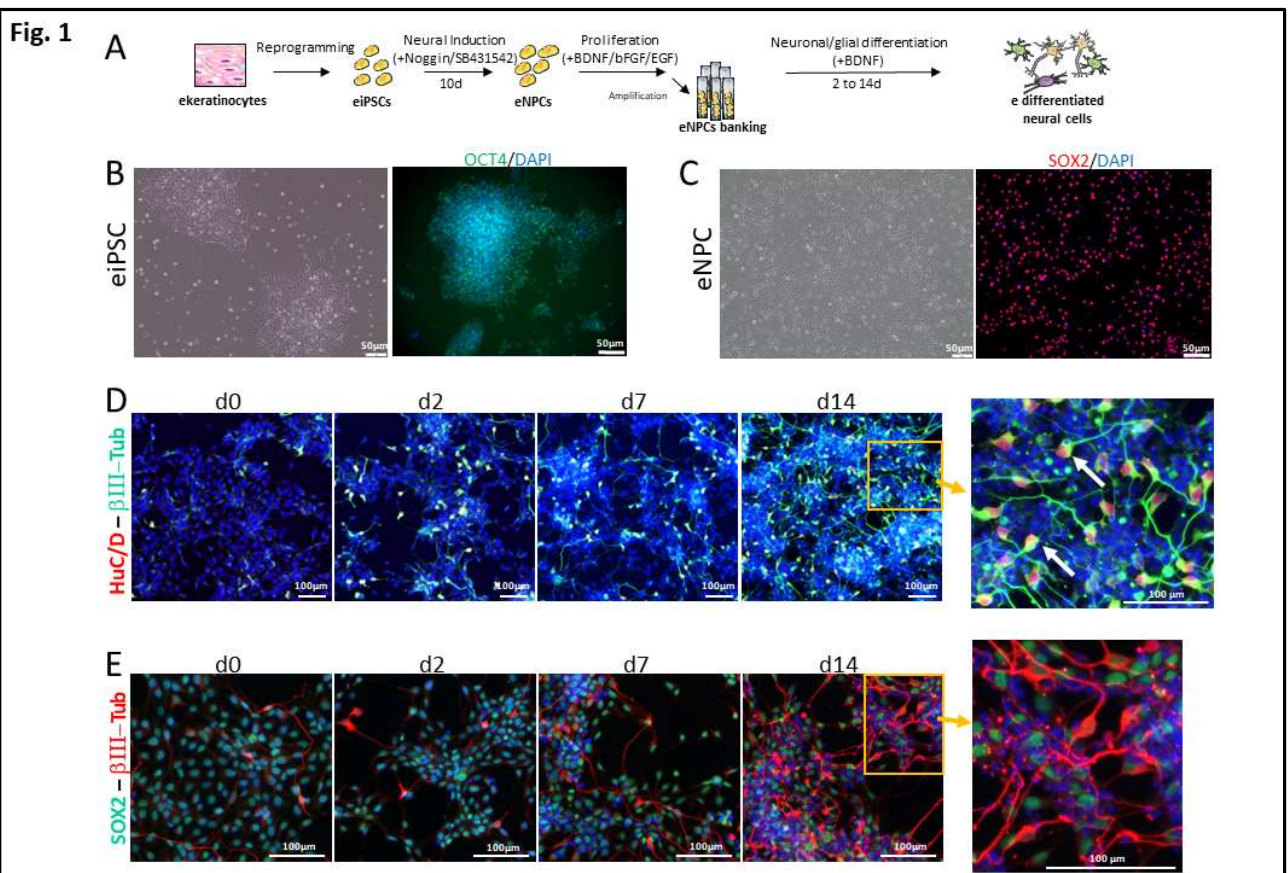


Fig.1 Derivation of neural progenitors and neurons from equine iPSCs. A/ Schematic representation of the experimental procedure. B/ Bright field images and immunofluorescence labeling of eiPSCs with antibodies directed against OCT4 (green, right panel). C/ Bright field images and immunofluorescence labeling of eNPCs with antibodies directed against SOX2 (red). D/ Immunofluorescence labeling of equine brain cells from day 0 to day 14 of differentiation. Antibodies directed against β III-Tubulin (green) and HuC/D reveal equine neurons. D/ Antibodies directed against SOX2 (green) and β III-Tubulin (red) reveal eNPCs and neurons, respectively. Nuclei were stained with DAPI (blue).

Equine iPSC-derived neural cells are permissive to West Nile virus

To assess their permissivity to WNV_{NY99}, cells were infected at MOI 10⁻¹ for 48h (eNPC) and 96h (eNe) and immunostained with anti-WNV-E3 antibody. Equine NPCs were massively infected (Fig. 2A, left panel) but infection of eNe, albeit existing, was rare (Fig. 2A, right panel). This weak level of infection, coupled to a strong cellular death in differentiated cultures, provided poor conditions for testing antiviral compounds. We thus restricted further study to eNPCs. Immunofluorescence labeling with WNV-E3 antibody of eNPC infected for 24h, 48h and 72h at MOI 10⁻¹ showed the virus spread in these cells (Fig. 2B). Viral replication was confirmed by quantification of viral RNA by RT-qPCR (Fig. 2C) and virus titers by end-point dilution (Fig. 2D) in supernatants. A dose response study, with MOI comprise between 10⁻⁴ and 1, showed dose-dependent changes in viral infection (Fig. 2E). At MOI 10⁻¹, increase in viral infection from 24hpi to 72hpi was similarly detected by image analysis (Fig. 2E), RT-qPCR (Fig. 2C) and titration (Fig. 2D), demonstrating that image-based analysis provides a suitable and rapid method to quantify viral infection in eNPCs. Simultaneous quantification of total cells by DAPI staining showed that, at the highest MOI, the virus altered eNPC growth and survival (Fig. 2F).

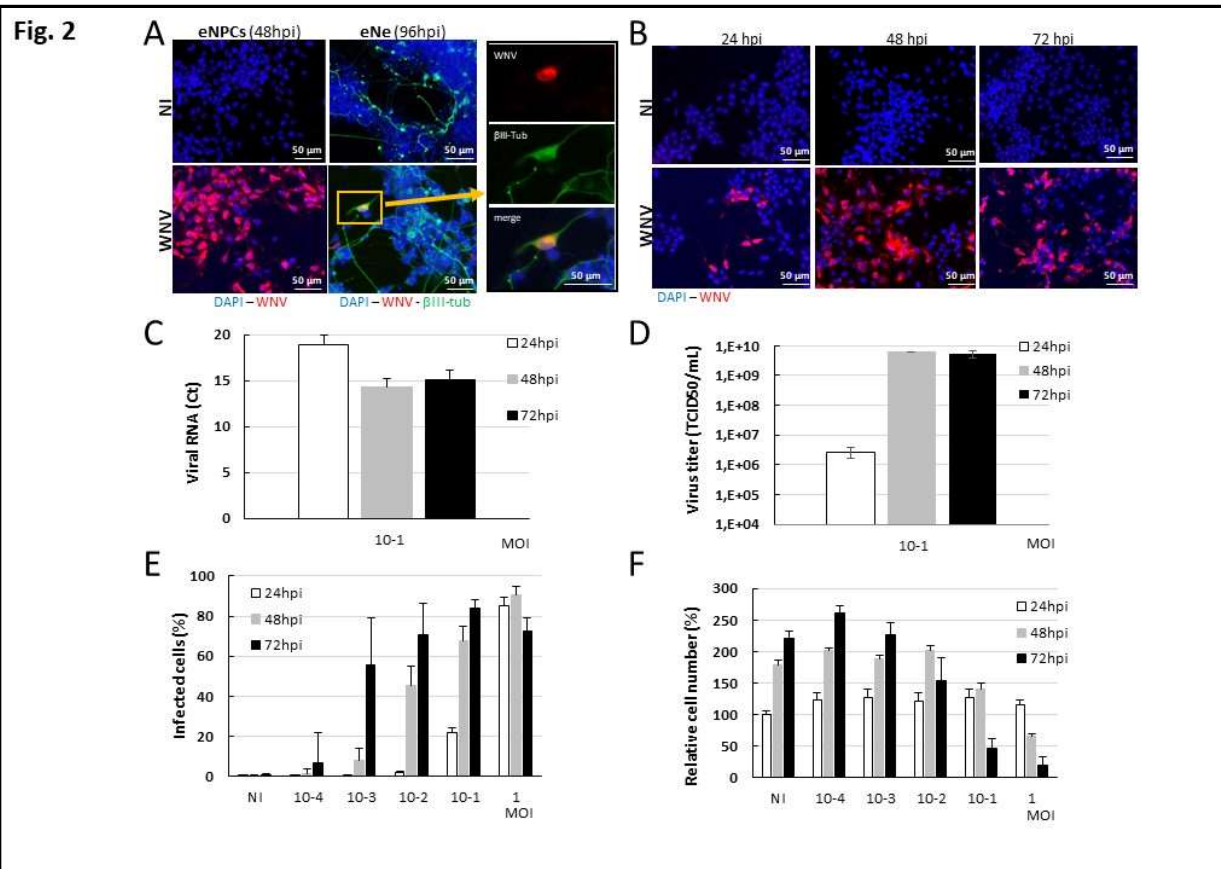


Fig.2 Permissivity of equine neural progenitor cells and neurons to WNV. Equine NPCs (A-D) and eNPCs differentiated for 12 days (eNe, A) were infected with WNV_{NY99} at MOI 10⁻¹. (A) Immunofluorescence labeling with antibodies against WNV-E3 (red) and βIII-Tubulin (green). (B) Immunofluorescence labeling with WNV-E3 antibody (red) show virus spreading. Cells were stained with DAPI (blue). (C) RNA from supernatant was analyzed by RT-qPCR. (D) Supernatant was titrated by end-point dilution (TCID50). (E-F) Equine NPCs were infected at MOI from 10⁻⁴ to 1 and enumerated automatically based on fluorescent staining using an OPERA instrument. Enumeration of (E) WNV-infected eNPCs (WNV-E3 antibody) and (F) total eNPCs number (DAPI staining). Normalization was to non-infected eNPCs at 24h. Results are representative of 3 independent experiments performed in triplicate. Data are expressed as the mean +/- SD.

Phenotypic screen using eNPCs identifies compounds with antiviral and proviral properties

We next used the WNV_{NY99}-infected eNPCs to screen a library of 41 chemical compounds selected for their antiviral activity against human and equine viruses (Supplementary Table 1). The experimental design is schematically represented in Figure 3A. Equine NPCs were pre-treated with each compound (10 or 1 μ M) for 2h before WNV infection at MOI 10⁻² for 48h. Toxicity and antiviral effect were determined by automated quantification of total cells labeled with DAPI and infected cells immunolabelled with WNV-E3 antibody, respectively. A hit was arbitrarily defined as a compound inducing a reduction of at least 25% of infected cells and less than 20% cell loss. Of all compounds tested at 10 μ M (Fig. 3B), 42.5% (17/40) were toxic, suggesting that eNPCs were particularly sensitive to drugs. Among the non-toxic molecules (23/40), 19 (favipiravir, nelarabine, capecitabine, sofosbuvir, herpes virus and reverse transcriptase inhibitors, amantadine, isatin, maribavir, DMXAA and efloornithin) had no antiviral activity against WNV. The remaining 4 compounds, 2'C-methylcytidine (2'-CMC), arbidol and ribavirine reduced the percentage of infected cells to 40 $\pm$ 10%, 70 $\pm$ 10% and 60 $\pm$ 20%, respectively and were thus considered to be hits (Fig. 3B). Surprisingly, atorvastatin induced a 2.5-fold increase in the percentage of infected cells, revealing a pro-viral effect. For toxic compounds, a second screen was performed at 1 μ M (Fig. 3D). Although cytotoxicity was reduced, cellular loss was found to still be above 20% for all compounds, except for fludarabine which nonetheless showed no antiviral activity. Of note, mycophenolic acid and brequinar displayed strong antiviral activity, albeit inducing

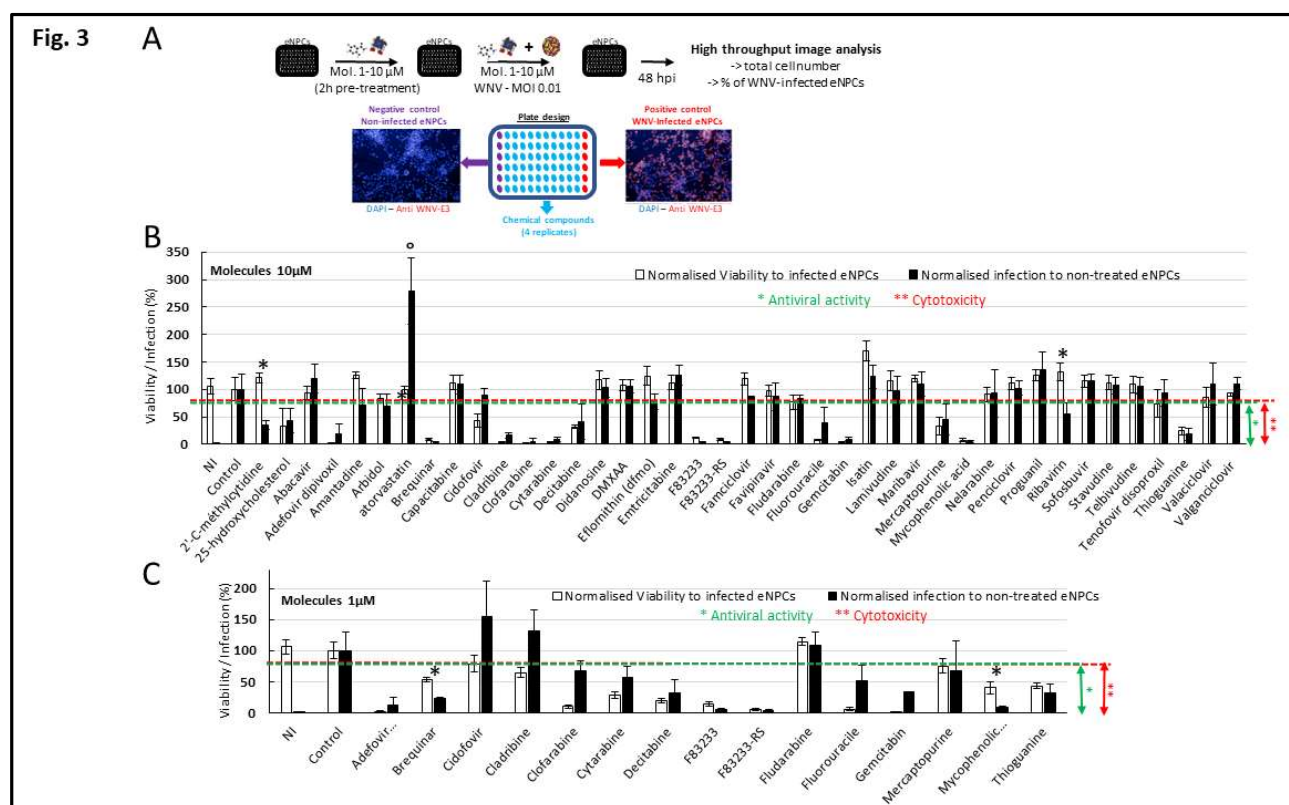


Fig.3 Screen of 41 compounds for their antiviral activity against WNV in eNPCs. (A) Schematic representation of the phenotypic screen. A hit was arbitrary defined as reducing infection by 25% and showing less than 20% toxicity. (B) Screen of 40 compounds at 10 μ M. (C) Screen of 15 compounds at 1 μ M. Results are representative of 2 independent screens (at each dose) performed in quadruplicate. Total number of cells was normalized to non-treated WNV-infected cells. Percentage of infection was normalized to non-treated WNV-infected eNPCs. Data are expressed as the mean $\pm$ SD.

203 more than 50 % cell loss (Fig. 3D). These results are summarised in Table 1. In order to verify the effect
 204 of the 4 compounds identified as modulators of WNV infection, we next quantified viral RNA and
 205 infectious viral particles in supernatants of eNPCs treated or not with 10 μ M of 2'-CMC, arbidol,
 206 ribavirin or atorvastatin (Fig. 4). 2'-CMC and arbidol induced a significant decrease in viral RNA (Fig. 4
 207 A, B) and viral titers (Fig. 4 E, F), confirming their antiviral impact. Ribavirin however was not confirmed
 208 at the dose used (Fig. 4C, G), as statistical significance was not reached. The proviral effect of
 209 atorvastatin was also confirmed, as a significant increase in viral RNA and infectious viral particles (Fig.
 210 4 D, H) was observed. Thus, our newly developed screen based on image analyses permitted efficient
 211 identification of molecules that inhibit or promote WNV replication in equine brain cells, as well as
 212 simultaneous assessment of their toxicity.
 213

Fig. 4

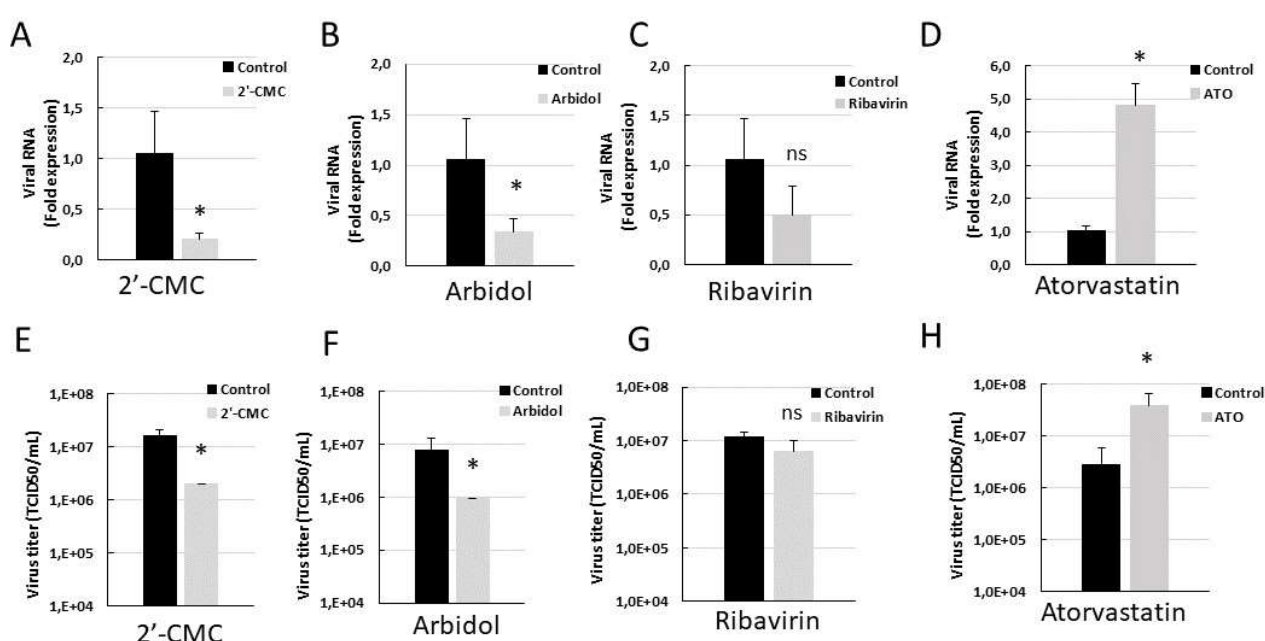


Fig.4 Anti- and pro-viral effects of 2'CMC, arbidol, ribavirin, and atorvastatin in WNV-infected eNPCs.

Supernatants of WNV-infected eNPCs, non-treated or treated with compounds at 10 μ M, were collected 48 hpi and analyzed for (A-D) viral RNA expression (RT-qPCR) and (D-F) viral titer (TCID50/ml). Results are representative of 3 independent experiments performed in triplicate. They are expressed as the mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed using a two-tailed unpaired Mann Whitney test. ns, non-significant ($p > 0.05$), * $p < 0.05$.

Table 1

Compounds	Type	Viral replication	Cytotoxicity
2'-C-methylcytidine	DAA-NA	AV	
25-hydroxycholesterol	HDA		Tx
Abacavir	DAA-RTI	NoA	
Adefovir dipivoxil	DAA-HVI		Tx
Amantadine	HDA	NoA	
Arbidol	HDA	AV	
Atorvastatin	HDA	PV	
Brequinar	HDA		Tx
Capecitabine	N/A	NoA	
Cladribine	N/A		Tx
Chlofarabine	N/A		Tx
Cidofovir	DAA-HVI		Tx
Cyclopilin inhibitor F83233	HDA		Tx
Cyclopilin inhibitor F83233RS	HDA		Tx
Cytarabine	N/A		Tx
Decitabine	DAA-NA		Tx
Didanosine	DAA-RTI	NoA	
DMXAA	HDA	NoA	
Eflornithin (dfmo)	HDA	NoA	
Emtricitabine	DAA-RTI	NoA	
Famciclovir	DAA-HVI	NoA	
Favipiravir	DAA-NA	NoA	
Fluorouracile	DAA-NA		Tx
fludarabine	DAA-NA		Tx
Gemcitabine	DAA-NA		Tx
Isatin	HDA	NoA	
Lamivudine	DAA-RTI	NoA	
Maribavir	DAA	NoA	
Mercaptopurine	DAA-NA		Tx
Mycophenolic acid	HDA		Tx
Nelarabine	N/A	NoA	
Penciclovir	DAA-HVI	NoA	
Ribavirin	DAA-NA, HDA	AV	
Sofosbuvir	DAA-NA	NoA	
Stavudine	DAA-RTI	NoA	
Telbivudine	DAA-RTI	NoA	
Tenofovir disoproxil	DAA-RTI	NoA	
Thioguanine	DAA-NA		Tx
Valaciclovir	DAA-HVI	NoA	
Valganciclovir	DAA-HVI	NoA	

Table 1. Summary of the antiviral and toxicity activities of the 41 selected compounds on WNV-infected eNPCs. DAA, direct-antiviral activity, HDA, host-directed antiviral, NA, nucleoside analog, RTI, reverse transcriptase inhibitor, HVI, herpes virus inhibitor, VEI, virus entry inhibitor, Tx, toxic. AV, antiviral activity. NoA, No antiviral activity. PV, pro-viral activity.

214 **Selectivity index for 2'-CMC, arbidol and ribavirin**

215 Using the same experimental design (Fig. 2A), the dose response was evaluated to determine the
 216 IC₅₀/CC₅₀ (half maximal inhibitory/cytotoxicity concentration) and SI (selectivity index) of 2'-CMC,
 217 arbidol and ribavirin. As shown in Fig. 5, the drugs were effective in the 10 micromolar range, with IC₅₀
 218 being $11 \pm 1.7 \mu\text{M}$, $15 \pm 0.3 \mu\text{M}$ and $11.1 \pm 1.8 \mu\text{M}$ for 2'-CMC (Fig. 5A), arbidol (Fig. 5B), and ribavirin
 219 (Fig. 5C), respectively. Two'-CMC presented the best SI (5.3) whereas arbidol had a SI of only 1.2,
 220 indicating for this last compound a toxicity in the same range of concentrations as antiviral activity.
 221

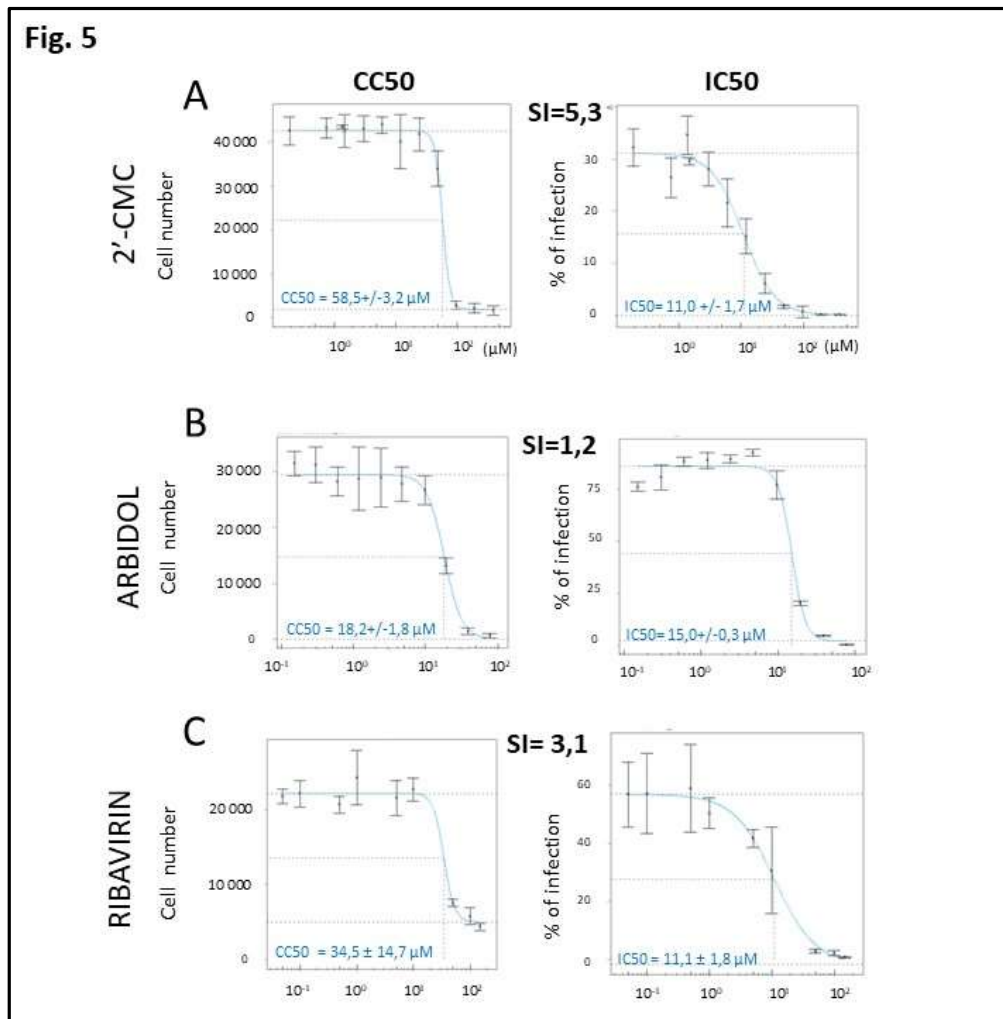


Fig.5 Selectivity index of ribavirin, 2'CMC and arbidol. WNV-infected eNPCs were treated with increasing concentration of selected compounds and analysed at 48hpi. Total and infected cells were enumerated automatically based on DAPI staining and immunostaining with an anti-WNV-E3 antibody, respectively. (A) 2'CMC, (B) arbidol and (C) ribavirin. Results are representative of 3 independent experiments performed in triplicate. They are expressed as the mean $\pm$ SD. CC, cytotoxicity concentration. IC, inhibitory concentration. SI, selectivity index.

222 **Atorvastatin, simvastatin, lovastatin and fluvastatin have a pro-viral effect on WNV-infected eNPCs.**
 223 The observation that atorvastatin had a pro-viral effect raised the question of whether other statins
 224 may act similarly. We thus infected the eNPCs with WNV_{NY99} at MOI 5.10⁻³ (approximately 25% of
 225 infected cells) and treated the cells as previously described with 3 additional statins: fluvastatin,
 226 simvastatin and lovastatin, all at 10μM. All statins induced a significant increase in the percentage of
 227 infected eNPCs compared with non-treated cells (Fig. 6A, B). Confirmation of a proviral role was
 228 obtained for all of them by quantification of viral RNA (Fig. 6C) and infectious viral particles (Fig. 6D) in
 229 the supernatants. In these latter experiments, fluvastatin was used at 1 μM (Fig. 6C, D), in order to
 230 avoid any bias due to toxicity when used at 10 μM (Fig. 6B).
 231

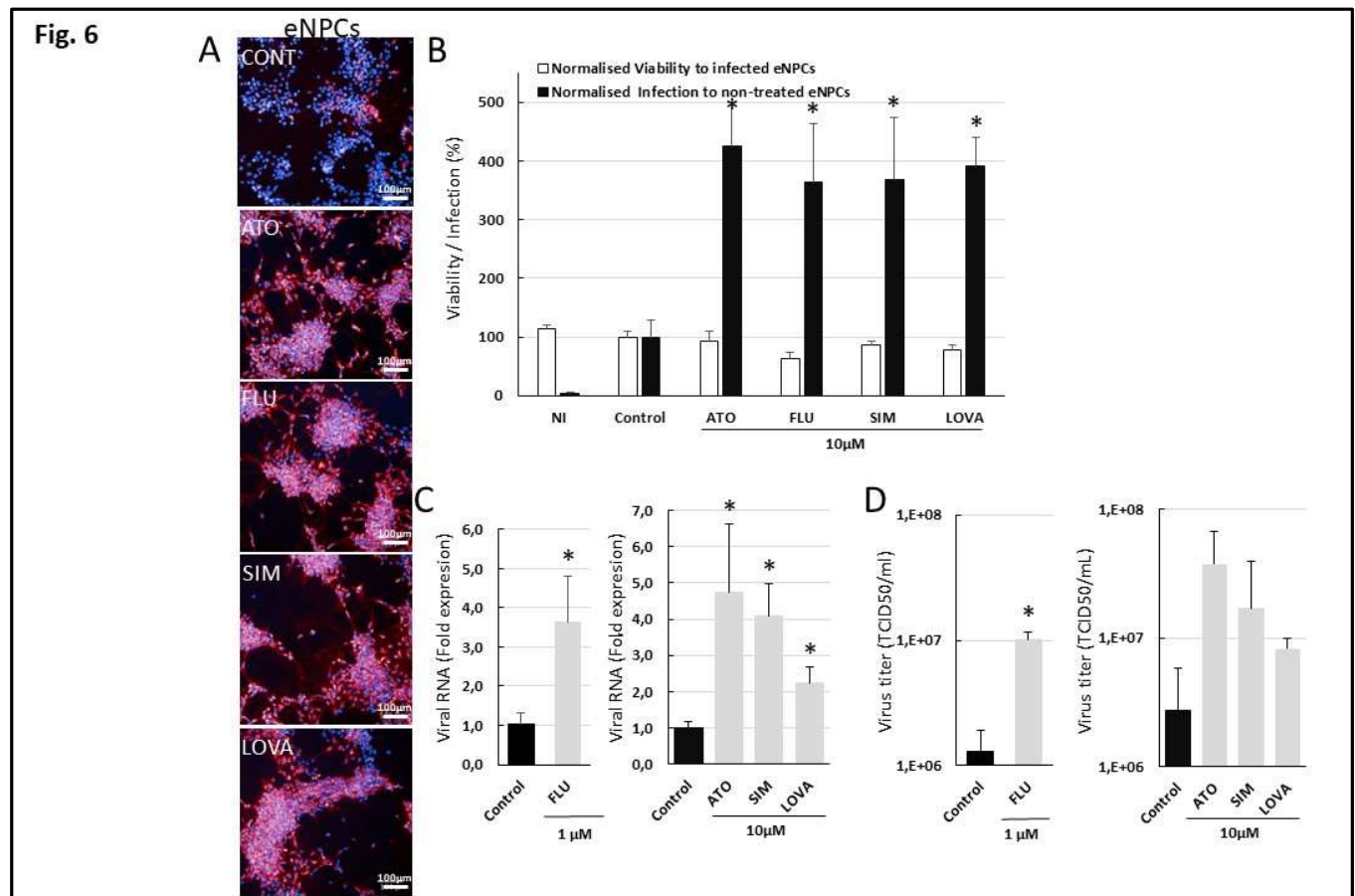


Fig.6 Statins have a proviral role in WNV-infected eNPCs. WNV-infected eNPCs (MOI 5.10⁻³) were treated with 1 or 10μM atorvastatin, fluvastatin, simvastatin or lovastatin as in Fig.3A. (A) Photomicrographs of WNV-infected eNPCs treated or not treated with statins. Cells were immunostained with anti-WNV-E3 antibody. (B) Automated enumeration of total cell number based on DAPI staining and percentage of infected cells based on immunostaining with anti-WNV-E3 antibody. Quantification of (C) viral RNA and (D) virus titers in supernatant. Results are representative of 3 independent experiments performed in triplicate. They are expressed as the mean +/- SD. Statistical analysis was performed using a two-tailed Mann Whitney test. ns, non-significant (p>0.05), *p<0.05. ATO, atorvastatin. FLU, fluvastatin. SIM, simvastatin. LOVA, lovastatin.

232 **Statins have no effect or an anti-viral effect on WNV-infected VERO, A549 and human NPCs.**
 233 Given that statins have been described to have broad spectrum antiviral activity (22), the observation
 234 of a pro-viral effect in WNV-infected eNPCs was striking. To clarify their role, we further assessed their
 235 anti-WNV activity in 2 cell lines (VERO and A549) and in neural progenitor cells of human origin using
 236 an experimental design similar to that previously described. In VERO (Fig. 7A-C) and A549 (Fig. 7D-F)
 237 cells, of the statins tested at 10 μ M, an effect was observed only with fluvastatin, which induced a
 238 significant decrease of 42% and 38% in the percentage of infected cells, respectively (Fig. 7A, B). This
 239 was confirmed by quantification virus titer in supernatant (Fig. 7C, F). In hNPCs, all four statins exerted
 240 an antiviral effect with atorvastatin having the strongest impact, as determined by fluorescent
 241 microscopy and enumeration of infected cells (Fig. 7G, H). Except for simvastatin, this was confirmed
 242 by quantification of virus titers in supernatants (Fig. 7I). Thus, our results revealed differential effects
 243 of statins depending on cellular types and species, with a proviral effect that is specific to neural
 244 progenitor cells of equine origin.

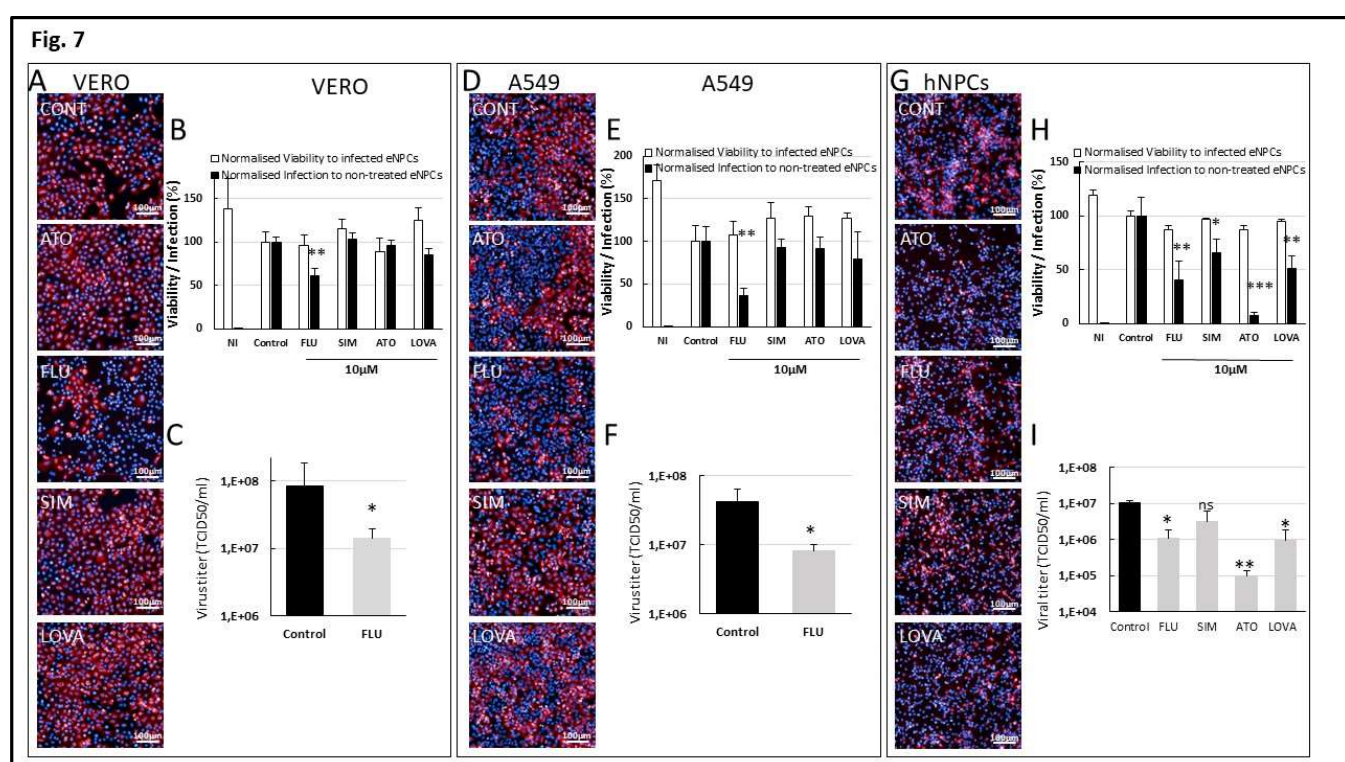


Fig.7 Statins have no role or an anti-viral role in WNV-infected VERO, A549 cells and hNPCs. WNV-infected cells (MOI 10⁻² for VERO, A549, hNPCs) were treated with 10 μ M atorvastatin, fluvastatin, simvastatin or lovastatin as in Fig 3A. Analysis was performed at 72 hpi (VERO) or 48 hpi (A549, hNPCs). (A, D, G) Photomicrographs of WNV-infected VERO (A), A549 (D) and hNPCs (G) treated or not with statins. Cells were immunostained with anti-WNV-E3 antibody. (B, E, H) Automated enumeration of total cell number based on DAPI staining and percentage of infected cells based on immunostaining with an anti-WNV-E3 antibody. Quantification of virus titers (C, F, I) in supernatants of VERO (C), A549 (F) and hNPCs (I). Results are representative of 3 independent experiments performed in triplicate. They are expressed as the mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed using a two-tailed Mann Whitney test. ns, non-significant ($p > 0.05$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

DISCUSSION

WNV is a global health threat for both human and equine populations against which no antiviral drugs are currently available. The generation of brain cells from equine iPSCs has unlocked the development of new *in vitro* models of improved relevance in equines (14, 15). Here, we developed a novel microplate assay based on WNV-infected eNPCs and screened a chemical library of 41 compounds for their therapeutic potential. Compounds with antiviral and unexpected proviral activity were found.

Our study confirmed the potential of equine iPSCs to generate equine brain cells. By infecting the latter, we found that both eNPCs and eNe were permissive to WNV_{NY99}, although infection levels were much lower in eNe. This was in striking contrast with the observation made by Fortuna et al. (15), who reported no infection in eNPCs and high infection in eNe, using the WNV_{NSW2011} strain. This discrepancy may be attributed to the use of different virus strains or to differences in the neuronal subtypes generated from equine iPSCs, as neuronal subtypes have different sensitivity to WNV (23). The non-permissivity of eNPCs in Fortuna's study is however surprising, as NPCs, at least those of human origin, are known to be highly permissive to a wide range of viruses (11, 24, 25).

We demonstrated for the first time the feasibility of using WNV-infected equine brain cells to set up a microplate assay and perform a pilot screen, assessing the antiviral activity and cytotoxicity of 41 chemical compounds. Among these, 2'-CMC, a nucleoside analog known to inhibit the viral polymerase of several flaviviruses (26–28), had the most robust activity. As no antiviral activity against WNV had been previously described for this compound, our results enlarge its spectrum of action within the *Flavivirus* genus and across species and identify a lead candidate, which calls for assessment of the antiviral activity of additional 2'-C-methylated nucleoside derivatives. Ribavirin is another nucleotide analog identified in our screen. It is known to have a moderate effect on flaviviruses and conflicting data have been reported in human neural progenitors (29, 30). Our results support a similar moderate effect in WNV-infected eNPCs. Of note, two other nucleoside analogs that also inhibit the viral polymerase, favipiravir and sofosbuvir, were inactive in eNPCs despite a known capacity to block WNV in human cell lines (31, 32). It is probable that favipiravir, which generally inhibits viral replication in the 100 µM range, was inactive due to the lower dose used in our study (10 µM). Such, however, should not be the case for sofosbuvir, as its activity was observed in the micromolar range in 3 human cell lines (32). Its inactivity in eNPCs may thus rather be attributed to insufficient uptake or conversion of the compound into its tri-phosphate active form, or alternatively, to its rapid elimination following extensive deamination or demethylation. This differential role of a viral polymerase inhibitor on WNV-infected eNPCs and human cell lines underscores the importance of assessing the antiviral activity of compounds, including those acting directly against the virus, on relevant cell type and species.

The proviral role of statins that we observed in WNV-infected eNPC was highly surprising as, so far, statins were rather known to block the replication of viruses, including WNV and other flaviviruses, in multiple cellular types (reviewed in 19). We dismissed the possibility that it may be a particularity of neural progenitor cells as statins inhibited WNV (our results) and Japanese encephalitis virus (33) replication in human neural progenitors. Rather the proviral role could be a species specificity that could be explained, at least in part, by a differential effect on the human and equine hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA R) enzyme, the described target of statins whose inhibition leads to a decrease in cellular cholesterol. Similar host-specific effects in the inhibition of viral replication have already been documented for other small molecule compounds (34). At present, the molecular mechanisms that underlie the proviral effect in equine brain cells remains to be unravelled, but this unexpected observation further underscores the importance of using cellular

models of relevant cell type and species for assessing the role of antiviral molecules. This may reduce pointless pre-clinical and clinical assays.

Conclusion

Viral encephalitis continues to pose a significant threat to the equine industry (35). The discovery of effective antiviral compounds most certainly relies on the development of relevant *in vitro* models. As a first step, our study provides a novel assay based on equine brain cells that is suitable for antiviral research. It paves the way towards the development of more sophisticated 2D and 3D *in vitro* models representative of an increased diversity of equine neural population and to future studies aimed at discovering antiviral molecules against diverse neurotropic equine viruses.

ACKNOWLEDGMENTS

We are most grateful to Dr N Haddad for her constant support and thoughtful suggestions.

REFERENCES

- Habarugira G, Suen WW, Hobson-Peters J, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H. 2020. West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and "One Health" Implications. *Pathog Basel Switz* 9:589.
- Ulbert S. 2019. West Nile virus vaccines - current situation and future directions. *Hum Vaccines Immunother* 15:2337–2342.
- Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparç-Goffart I, Zientara S, Jourdain E, Lecollinet S. 2013. Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *Int J Environ Res Public Health* 10:6049–6083.
- Roche SE, Wicks R, Garner MG, East IJ, Paskin R, Moloney BJ, Carr M, Kirkland P. 2013. Descriptive overview of the 2011 epidemic of arboviral disease in horses in Australia. *Aust Vet J* 91: 5–13.
- Sinigaglia A, Peta E, Riccetti S, Barzon L. 2020. New avenues for therapeutic discovery against West Nile virus. *Expert Opin Drug Discov* 15: 333–348.
- Fellicetti T, Manfroni G, Cecchetti V, Cannalire R. 2020. Broad-Spectrum Flavivirus Inhibitors: a Medicinal Chemistry Point of View. *ChemMedChem* 15:2391–2419.
- Valle-Casuso J-C, Gaudaire D, Martin-Faivre L, Madeline A, Dallemagne P, Pronost S, Munier-Lehmann H, Zientara S, Vidalain P-O, Hans A. 2020. Replication of Equine arteritis virus is efficiently suppressed by purine and pyrimidine biosynthesis inhibitors. *Sci Rep* 10:10100.
- Thieulent CJ, Hue ES, Fortier CI, Dallemagne P, Zientara S, Munier-Lehmann H, Hans A, Fortier GD, Pitel P-H, Vidalain P-O, Pronost SL. 2019. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology* 526:105–116.
- Harschnitz O, Studer L. 2021. Human stem cell models to study host-virus interactions in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 21: 441–453.
- Trevisan M, Sinigaglia A, Desole G, Berto A, Pacenti M, Palù G, Barzon L. 2015. Modeling Viral Infectious Diseases and Development of Antiviral Therapies Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Systems. *Viruses* 7:3835–3856.
- Scordel C, Huttin A, Cochet-Bernoin M, Szelechowski M, Poulet A, Richardson J, Benchoua A, Gonzalez-Dunia D, Eloit M, Coulpier M. 2015. Borna disease virus phosphoprotein impairs the developmental program controlling neurogenesis and reduces human GABAergic neurogenesis. *PLoS Pathog* 11:e1004859.
- Fares M, Cochet-Bernoin M, Gonzalez G, Montero-Menei CN, Blanchet O, Benchoua A, Boissart C, Lecollinet S, Richardson J, Haddad N, Coulpier M. 2020. Pathological modeling of TBEV infection reveals differential innate immune responses in human neurons and astrocytes that correlate with their susceptibility to infection. *J Neuroinflammation* 17:76.
- Dawes BE, Gao J, Atkins C, Nelson JT, Johnson K, Wu P, Freiberg AN. 2018. Human neural stem cell-derived neuron/astrocyte co-cultures respond to La Crosse virus infection with proinflammatory cytokines and chemokines. *J Neuroinflammation* 15:315.

- 446 14. Sharma R, Livesey MR, Wyllie DJA, Proudfoot C, Whitelaw CBA, Hay DC, Donadeu FX. 2014.
447 Generation of functional neurons from feeder-free, keratinocyte-derived equine induced
448 pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 23:1524–1534.
- 449 15. Fortuna PRJ, Bielefeldt-Ohmann H, Ovchinnikov DA, Wolvetang EJ, Whitworth DJ. 2018. Cortical
450 Neurons Derived from Equine Induced Pluripotent Stem Cells Are Susceptible to Neurotropic
451 Flavivirus Infection and Replication: An In Vitro Model for Equine Neuropathic Diseases. *Stem*
452 *Cells Dev* 27:704–715.
- 453 16. Brnic D, Stevanovic V, Cochet M, Agier C, Richardson J, Montero-Menei CN, Milhavet O, Eloit M,
454 Coudrier M. 2012. Borna disease virus infects human neural progenitor cells and impairs
455 neurogenesis. *J Virol* 86:2512–2522.
- 456 17. Boissart C, Poulet A, Georges P, Darville H, Julita E, Delorme R, Bourgeron T, Peschanski M,
457 Benchoua A. 2013. Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the
458 superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug
459 screening. *Transl Psychiatry* 3:e294.
- 460 18. Donadieu E, Lowinski S, Servely J-L, Laloy E, Lilin T, Nowotny N, Richardson J, Zientara S,
461 Lecollinet S, Coudrier M. 2013. Comparison of the neuropathology induced by two West Nile
462 virus strains. *PLoS One* 8:e84473.
- 463 19. Thieulent C, Fortier C, Munier-Lehmann H, Suzanne P, Dallemagne P, Zientara S, Hans A, Paillet
464 R, Vidalain P-O, Pronost S, Hue E. 2020. Screening of potential antiviral molecules against equid
465 herpesvirus-1 using cellular impedance measurement: Dataset of 2,891 compounds. *Data Brief*
466 33:106492.
- 467 20. Ahmed-Belkacem A, Colliandre L, Ahnou N, Nevers Q, Gelin M, Bessin Y, Brillet R, Cala O,
468 Douguet D, Bourguet W, Krimm I, Pawlotsky J-M, Guichou J-F. 2016. Fragment-based discovery
469 of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral
470 activities. *Nat Commun* 7:12777.
- 471 21. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One*
472 10:e0146021.
- 473 22. Gorabi AM, Kiaie N, Bianconi V, Jamialahmadi T, Al-Rasadi K, Johnston TP, Pirro M, Sahebkar A.
474 2020. Antiviral effects of statins. *Prog Lipid Res* 79:101054.
- 475 23. Omalu BI, Shakir AA, Wang G, Lipkin WI, Wiley CA. 2003. Fatal fulminant pan-meningo-
476 polioencephalitis due to West Nile virus. *Brain Pathol Zurich Switz* 13:465–472.
- 477 24. Riccetti S, Sinigaglia A, Desole G, Nowotny N, Trevisan M, Barzon L. 2020. Modelling West Nile
478 Virus and Usutu Virus Pathogenicity in Human Neural Stem Cells. *Viruses* 12:882.
- 479 25. D'Aiuto L, Di Maio R, Heath B, Raimondi G, Milosevic J, Watson AM, Bamne M, Parks WT, Yang
480 L, Lin B, Miki T, Mich-Basso JD, Arav-Boger R, Sibille E, Sabuncian S, Yolken R, Nimgaonkar V.
481 2012. Human induced pluripotent stem cell-derived models to investigate human
482 cytomegalovirus infection in neural cells. *PLoS One* 7:e49700.
- 483 26. Eyer L, Nencka R, Huvarová I, Palus M, Joao Alves M, Gould EA, De Clercq E, Růžek D. 2016.
484 Nucleoside Inhibitors of Zika Virus. *J Infect Dis* 214:707–711.
- 485 27. Eyer L, Šmídková M, Nencka R, Neča J, Kastl T, Palus M, De Clercq E, Růžek D. 2016. Structure-
486 activity relationships of nucleoside analogues for inhibition of tick-borne encephalitis virus.
487 *Antiviral Res* 133:119–129.
- 488 28. Lee J-C, Tseng C-K, Wu Y-H, Kaushik-Basu N, Lin C-K, Chen W-C, Wu H-N. 2015. Characterization
489 of the activity of 2'-C-methylcytidine against dengue virus replication. *Antiviral Res* 116:1–9.
- 490 29. Kim J-A, Seong R-K, Kumar M, Shin OS. 2018. Favipiravir and Ribavirin Inhibit Replication of
491 Asian and African Strains of Zika Virus in Different Cell Models. *Viruses* 10:72.
- 492 30. Lanko K, Eggermont K, Patel A, Kaptein S, Delang L, Verfaillie CM, Neyts J. 2017. Replication of
493 the Zika virus in different iPSC-derived neuronal cells and implications to assess efficacy of
494 antivirals. *Antiviral Res* 145: 82–86.
- 495 31. Escribano-Romero E, Jiménez de Oya N, Domingo E, Saiz JC. 2017. Extinction of West Nile Virus
496 by Favipiravir through Lethal Mutagenesis. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01400-17.
- 497 32. Dragoni F, Boccuto A, Picarazzi F, Giannini A, Giammarino F, Saladini F, Mori M, Mastrangelo E,
498 Zazzi M, Vicenti I. 2020. Evaluation of sofosbuvir activity and resistance profile against West
499 Nile virus in vitro. *Antiviral Res* 175:104708.
- 500 33. Wani MA, Mukherjee S, Mallick S, Akbar I, Basu A. 2020. Atorvastatin ameliorates viral burden
501 and neural stem/progenitor cell (NSPC) death in an experimental model of Japanese
502 encephalitis. *J Biosci* 45: 77.
- 503 34. Chung D. 2015. The Establishment of an Antiviral State by Pyrimidine Synthesis Inhibitor is Cell
504 Type-Specific. *J Antimicrob Agents* 1:101.
- 505 35. Lecollinet S, Pronost S, Coudrier M, Beck C, Gonzalez G, Leblond A, Tritz P. 2019. Viral Equine
506 Encephalitis, a Growing Threat to the Horse Population in Europe? *Viruses* 12.

Supplementary Table 1

Compounds	Suppliers	Catalogue no.
2'-C-methylcytidine	Ark Pharm, Inc.	AK-88474
25-hydroxycholesterol	Cayman Europe	T1097
Abacavir	TargetMol	T6367
Adefovir dipivoxil	TargetMol	T1675
Amantadine	Sigma	A1260
Arbidol	TargetMol	T0104
Atorvastatin	Sigma	PZ0001
Brequinar	Adooq Bioscience	A12442
Capecitabine	TargetMol	T1408
Cladribine	TargetMol	T2558
Chlofarabine	TargetMol	T0297
Cidofovir	TargetMol	T6244
Cyclophilin inhibitor F83233	in-house	
Cyclophilin inhibitor F83233RS	In-house	
Cytarabine	TargetMol	T1272
Decitabine	TargetMol	T1508
Didanosine	TargetMol	T2578
DMXAA	TargetMol	T6273
Eflornithin (dfmo)	Sigma	D193
Emtricitabine	TargetMol	T6214
Famciclovir	TargetMol	T1646
Favipiravir	TargetMol	T6833
Fluorouracile	AK Scientific, Inc.	AK-67526
fludarabine	TargetMol	T1038
Gemcitabine	TargetMol	T0251
Isatin	Sigma	T14618
Lamivudine	TargetMol	T0682
Maribavir	TargetMol	T2162
Mercaptopurine	TargetMol	T0010
Mycophenolic acid	Sigma	M5255
Nelarabine	AK Scientific, Inc.	R077
Penciclovir	TargetMol	T1643
Ribavirin	MedChemExpress	HY-B0434
Sofosbuvir	TargetMol	T6676
Stavudine	TargetMol	T1404
Telbivudine	TargetMol	T1513
Tenofovir disoproxil	TargetMol	T2409
Thioguanine	TargetMol	T3089
Valaciclovir	TargetMol	T1087
Valganciclovir	TargetMol	T1533

Supplementary Table 1. List of 41 selected compounds tested for their antiviral activity in WNV-infected eNPCs. Compounds were selected for their known activity against human and equine viruses.

2. les statines : des molécules provirales dans les cellules progénitrices neurales équine et antivirales dans les cellules neurales progénitrices humaines. Caractérisation de leur mode d'action

Cette partie présente les résultats qui n'ont pas été inclus dans l'article en préparation. A noter que certains de ces résultats sont préliminaires (expériences réalisées une seule fois).

Nous avons mis en évidence un effet proviral des statines à 10 et 1 μ M pour fluvastatine (FLU), atorvastatine (ATO) et lovastatine (LOVA) et à 10 μ M pour simvastatine (SIM) sur les eNPC infectées par le virus West-Nile (Figure 6 de l'article).

Ce résultat était inattendu au vu de la littérature. Celle-ci mentionnait en effet un rôle antiviral et proposait même les statines comme des antiviraux pan-*Flavivirus*, voir à plus large spectre.

Afin de mieux comprendre cet effet proviral, nous avons cherché à déterminer à quelle(s) étape(s) du cycle viral les statines exerçaient leur action, puis nous avons cherché à déterminer si la voie de synthèse de l'acide mévalonique qui conduit à la synthèse du cholestérol était impliquée.

2.1. Mécanisme d'action des statines dans les eNPC infectées par WNV

2.1.1. Etape(s) du cycle viral ciblée(s) par les statines

Pour identifier l'étape du cycle viral ciblé par les statines, nous avons réalisé deux séries d'expériences successives d'ajout des statines à différents temps.

Dans un premier temps, les statines ont été ajoutées comme indiqué dans la figure 18 (paragraphe 7 du matériel et méthodes) :

- Condition 1 : « en continu », dès le pré-traitement et tout au long de l'expérience
- Condition 2 : en pré-traitement (2 h avant l'infection)
- Condition 3 : pendant la phase d'adsorption uniquement (2 h)
- Condition 4 : après la phase d'adsorption uniquement (48 h)

Nous avons focalisé notre intérêt sur les 2 statines qui présentaient l'activité provirale la plus élevée, atorvastatine (ATO) et fluvastatine (FLU) (à 1 μ M). Les résultats sont présentés figure 20.

La mesure de la viabilité cellulaire n'indique pas un effet majeur d'ATO et FLU à 1 μ M sur les cellules, tels qu'un effet cytotoxique ou prolifératif, qui pourrait expliquer l'effet proviral (Figure 20 A, D).

Nous constatons avec FLU, une forte augmentation du pourcentage d'infection normalisé en condition (4) post-adsorption ($229 \pm 28,4$ %), comme nous le constatons dans la condition (1) ajout en continu ($249 \pm 13,6$ %). Pour les conditions (2) prétraitement et (3) adsorption, l'infection est similaire à l'infection en absence de molécule, avec respectivement les pourcentages d'infection normalisé ($110 \pm 40,8$ % et $104 \pm 27,1$ %) (Figure 20 A). Ce résultat est confirmé par la quantification des particules virales dans les surnageants, en condition (1) et (4) où, nous avons une augmentation de 1 Log par rapport à la condition contrôle (figure 20 C). De même, la quantité des ARN viraux dans les surnageants est augmentée d'un facteur 3 (Figure 20 B).

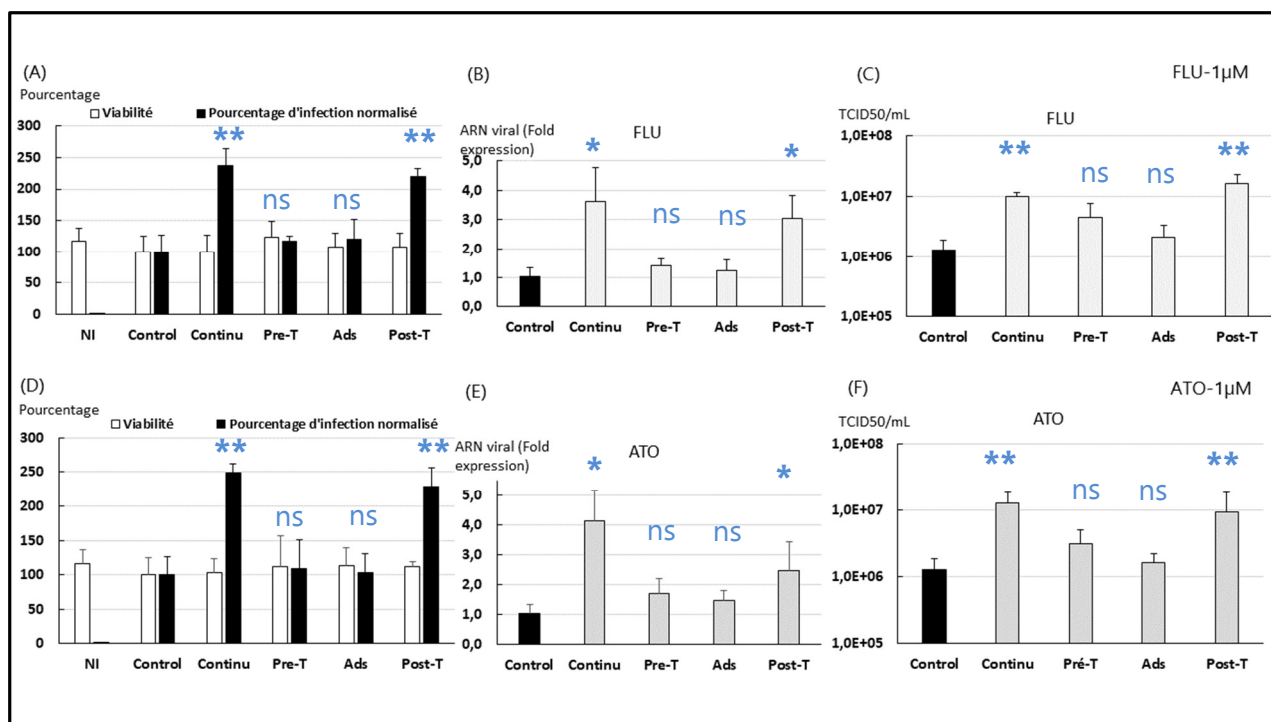


Figure 20 : **Atorvastatine (ATO) et Fluvastatine (FLU) exercent un effet proviral dans les eNPC après la phase d'adsorption du virus**

Continu : ATO et FLU ajoutés en continu : condition (1). **Pre-T** : ATO et FLU ajoutés en pré-traitement : condition (2) ; **Ads** : ATO et FLU ajoutés pendant l'adsorption : condition (3) ; **Post-T** : ATO et FLU ajoutés pendant la phase d'incubation condition (4) ; Ajout de FLU 1 μ M : (A) (B) (C) ; Ajout de ATO 1 μ M : (D) (E) (F). Quantification - de l'infection par imagerie cellulaire : (A) et (D) ; - des ARN viraux dans les surnageants (B) et (E) ; - des particules virales infectieuses dans les surnageants (C) et (F). Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle (sans ajout de molécule) pour (A) (B) (D) (E) ; Expression des résultats : moyenne +/- écart-type. Analyse statistique test de Mann-Whitney sur GraphPad Prism v9 : *p-value < 0,05 ; **p-value < 0,01 ; ns non significatif

Avec ATO, nous constatons également une forte augmentation du pourcentage d'infection en condition (1) ($238 \pm 27,0$ %) et en condition (4) ($220 \pm 12,4$ %) (Figure 20 D). Le pourcentage d'infection normalisé en condition (2) et (3) en présence d'ATO, ($117 \pm 8,2$ % et $120 \pm 31,4$ %, respectivement) est proche de celui observé en absence de molécule. Ces résultats sont confirmés par la quantification des ARN viraux et des particules virales infectieuses dans les surnageants (Figure 20 E, F). Nous constatons une augmentation des quantités d'ARN viraux moins importante en condition (4) d'un facteur 2,5 par rapport à la condition continu (1) (augmentation d'un facteur 4) et des quantités plus élevées d'ARN viraux dans les conditions (2) et (3) d'un facteur 1,5 environ. La quantification des particules virales infectieuses met en évidence une augmentation de 1 Log environ du nombre de particules virales en condition (4), et en condition (1) par rapport à la condition contrôle : infection sans ajout de molécule.

Nos résultats montrent que les statines, ATO et FLU à 1 μ M, n'ont pas d'effet sur les cellules en amont de l'infection. Ces premiers résultats ont permis de mettre en

évidence un profil d'action similaire pour les deux statines. Ils démontrent que leur action provirale n'est pas due à un effet « primant » la cellule (absence d'effet du pré-traitement), ou à un effet sur le virus lui-même (absence d'effet lors de la phase d'adsorption). Au contraire, le fait que l'effet proviral soit observé lorsque les statines sont ajoutées après la phase d'adsorption démontre que celles-ci exercent leur action provirale lors du cycle viral, à une ou des étape(s) entre la phase d'entrée et celle de relargage des particules virales infectieuses.

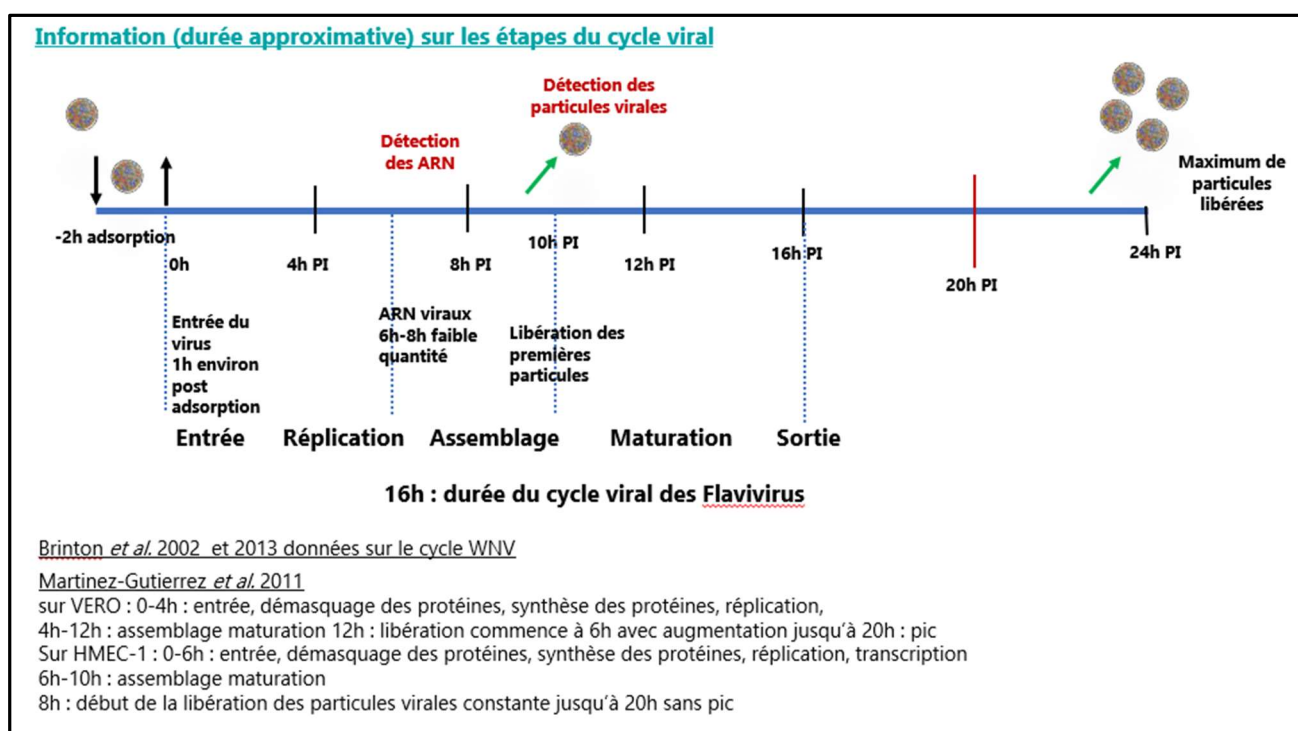


Figure 21 : **Etapes du cycle viral** (durée approximative) **du WNV en cellules de mammifère**. [47], [215], [216]

Nous avons ensuite voulu préciser l'étape ou les étapes du cycle viral ciblée(s), en réalisant une étude de « time of addition assay » plus précise. A partir des données de la littérature, nous avons établi le schéma présenté figure 21, montrant le déroulement temporel des différentes étapes de la réplication de WNV dans une cellule de mammifère.

Nous avons tout d'abord vérifié la durée du cycle viral dans les eNPC. Dans ce but, nous avons choisi d'infecter les cellules à une MOI égale à 2, suivant le schéma expérimental décrit paragraphe 6 figure 17 dans le matériel et méthodes. Les surnageants ont été prélevés à différents temps post infection (0, 1, 3, 6, 9, 12 et 19h) pour y quantifier les particules virales infectieuses et les ARN viraux.

Les résultats (Figure 22) montrent que les particules virales commencent à être libérées dans le surnageant 12h après l'infection. C'est entre 12 et 19h post-infection qu'il y a une forte augmentation du nombre des particules virales infectieuses libérées

dans le surnageant. Ces résultats montrent que le cycle du WNV dans les eNPC est semblable à celui décrit classiquement pour d'autres modèles cellulaires.

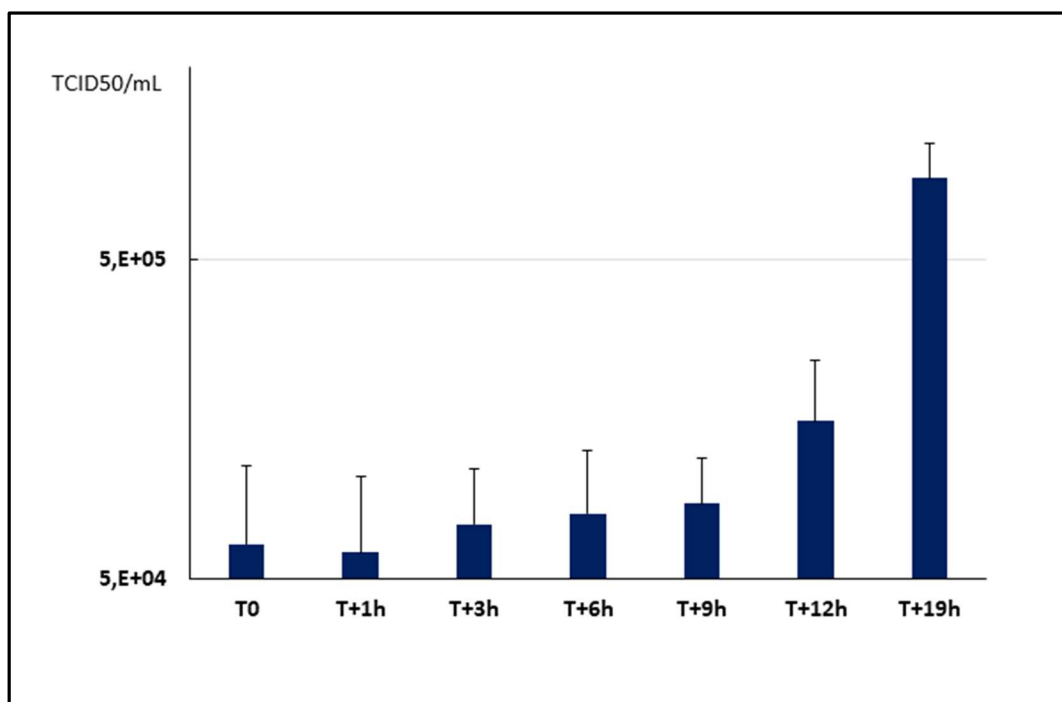


Figure 22 : **Caractérisation du cycle de réplication du virus West Nile dans les cellules eNPC.**

Le titre viral a été déterminé en TCID50/mL dans les surnageants de culture prélevés à différents temps après infection. Expression des résultats : moyenne +/- écart-type.

Nous avons choisi d'ajouter les molécules 1h, 3h, 6h, 9h et 12h post-infection (PI) (comme illustré figure 19 du matériel et méthodes). Nous avons réalisé cette expérience de « time of drug addition assay », à une MOI élevée ($MOI = 1$) à laquelle $85,4 \pm 4,2$ % de cellules sont infectées en 24 h. Pour des raisons pratiques, nous avons stoppé l'expérience 20h PI plutôt qu'à 16h PI (durée estimée d'un cycle viral).

Nous avons quantifié l'infection par imagerie cellulaire. Les résultats d'imagerie cellulaire sont présentés figure 23A pour FLU et 23 B pour ATO.

Comme attendu, l'effet proviral de FLU se manifeste lorsque la molécule est ajoutée après la phase d'adsorption ($120 \pm 17,9$ %). L'ajout de FLU à 1h PI montre un effet proviral plus important avec $131 \pm 5,0$ % de cellules infectées. Nous sommes alors à une étape précoce du cycle viral correspondant à la traduction des protéines, puis la réplication du WNV. A 3 et 6h PI, nous constatons également que l'ajout de FLU entraîne un effet proviral avec respectivement un pourcentage d'infection de $125,4 \pm 3,6$ % et $120,5 \pm 6,2$ %. Nous sommes alors toujours dans l'étape de réplication des ARN viraux et traduction des protéines virales. A partir de 6h, nous entrons dans la phase d'assemblage des particules virales. A 9h, PI, l'ajout de FLU entraîne un faible effet proviral ($114,7 \pm 6,8$ %). Nous abordons alors la libération de particules virales.

De même, comme attendu, l'effet proviral d'ATO se manifeste dès l'ajout post adsorption avec un pourcentage d'infection de $132 \pm 11,6$ %. L'effet proviral d'ATO est

maximal avec un ajout 3h PI. Nous avons alors $145 \pm 12,7$ % des cellules infectées. L'ajout à 6h post infection entraine un effet proviral important $138,0 \pm 16,1$ % de cellules infectées. A 9h post-infection, l'ajout d'atorvastatine a encore un faible effet proviral ($119,2 \pm 9,6$ %).

L'effet proviral marqué observé avec FLU et ATO à 1 μ M ajoutées entre 1 et 6h PI suggère que la réplication et l'assemblage des particules virales, les étapes majeures à ce stade du cycle réplcatif du WNV, sont favorisées par les statines.

Pour FLU et ATO, un ajout 12h PI n'a plus d'effet proviral (respectivement figure 23 A et B). Un effet proviral, faible est observé si FLU ou ATO sont ajoutés à 9h. Cela suggère que l'effet ne porte pas sur les étapes tardives, à savoir maturation et libération des particules virales.

Les profils obtenus sont les mêmes pour les deux statines. Le fait qu'elles soient efficaces (action provirale) lorsqu'elles sont ajoutées jusqu'à 6h PI suggère qu'elles n'affectent pas les étapes précoces du cycle viral (entrée et réplication). La perte d'efficacité quand l'ajout est effectué à 9h PI suggère de plus que la phase de relargage des particules virales infectieuses n'est pas non plus affectée. Ceci indique donc que les statines pourraient jouer un rôle facilitateur de l'infection à l'étape d'assemblage des particules.

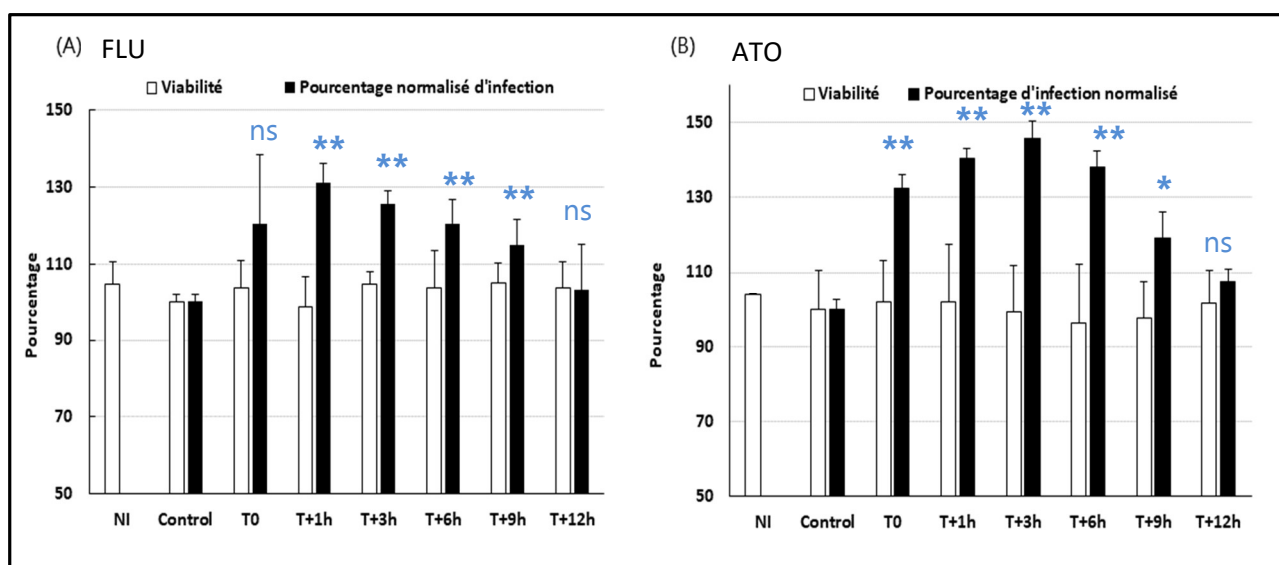


Figure 23 : **Quantification par imagerie cellulaire automatisée du Time of Drug Addition Assay**
 (A) FLU MOI 1 (B) ATO MOI 1. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle (Condition d'infection sans ajout de molécule) ; Expression des résultats : moyenne +/- écart-type.
 Analyse statistique test de Mann-Whitney sur GraphPad Prism v9 : *p-value < 0,05 ; **p-value < 0,01 ; ns non significatif

2.1.2. L'effet proviral des statines est-il médié par une inhibition de synthèse du cholestérol ?

Les statines peuvent agir à de multiples sites dans la cellule [217] mais leur rôle le plus connu est celui d'induire une diminution de la synthèse du cholestérol cellulaire

via l'inhibition de l'HMG-CoA réductase (hydroxy méthyl glutaryl-CoA réductase), une enzyme clé de la voie de synthèse de l'acide mévalonique (Figure 16).

Afin de déterminer si l'effet proviral des statines sur les eNPC est médié par une diminution du taux de cholestérol, nous avons cherché à inhiber cette voie en ciblant sa dernière étape. Nous avons utilisé le AY-9944, un inhibiteur de la 7-déhydro-cholestérol $\Delta 7$ réductase (DHCR7), une enzyme qui convertit le 7-déhydro-cholesterol en cholestérol (Figure 16).

Les expériences précédentes suggérant des mécanismes similaires de fluvastatine et atorvastatine, nous avons choisi de poursuivre cette partie du travail avec une seule molécule, l'atorvastatine.

Comme pour les expériences précédentes, les eNPC ont été infectées en suivant le schéma présenté figure 24. Un effet dose a été réalisé en ajoutant AY-9944 à différentes concentrations dans une gamme de 5 à 0,001 μM .

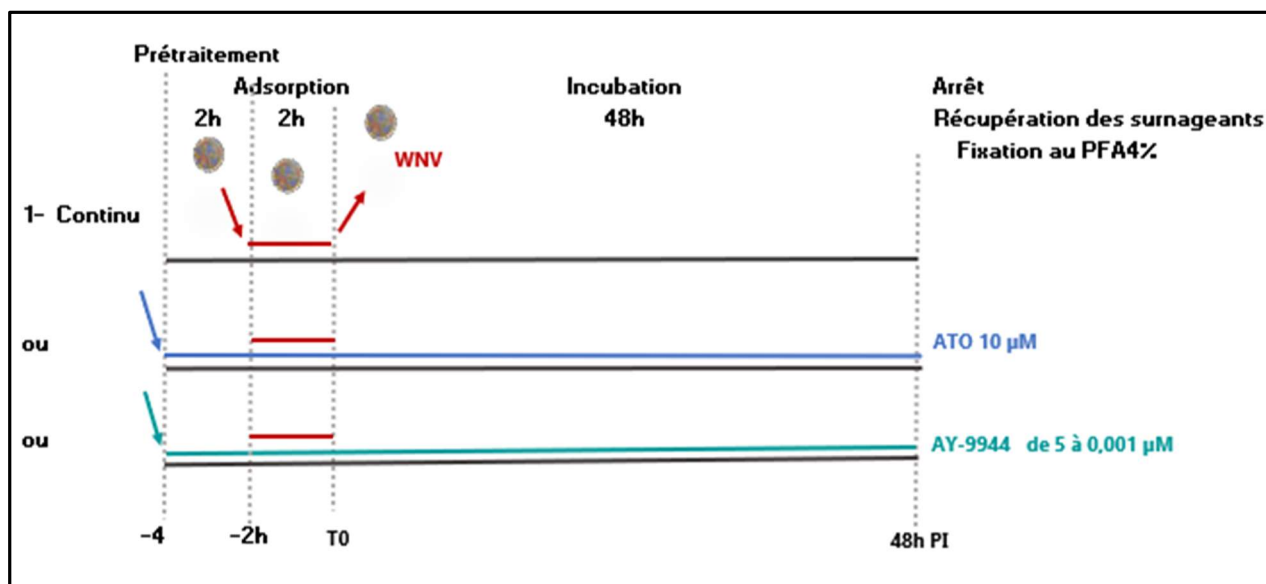


Figure 24 : **Schéma expérimental : Inhibition de la synthèse du Cholestérol par AY-9944**

La quantification du pourcentage de cellules infectées montre que, comme habituellement, atorvastatine à 10 μM favorise la réplication du WNV ($170,1 \pm 7,3 \%$). En revanche, le AY-9944 induit une diminution du pourcentage de cellules infectées. Cette diminution est dose-dépendante avec à 5 μM $43,6 \pm 10,4 \%$ et à 0.01 μM $70,3 \pm 10,2 \%$ des cellules infectées (Figure 25 A). Nous avons confirmé une diminution du nombre de particules virales dans les surnageants de 0,5 Log environ, en présence de AY-9944 à 0,5 μM (Figure 25 B). Cette expérience a été réalisée 2 fois et les résultats en imagerie et TCID50 sont concordants.

Ces résultats suggèrent qu'une diminution de la synthèse de cholestérol a un effet antiviral dans les eNPC et que par conséquent, l'effet proviral des statines ne serait pas médié par une diminution de cette synthèse. Ces résultats montrent aussi l'importance du cholestérol pour la réplication du WNV dans les eNPC, comme cela

avait été montré dans d'autres types cellulaires. Ils suggèrent enfin d'autres mécanismes d'action des statines responsables de l'effet proviral. Ce point reste à élucider.

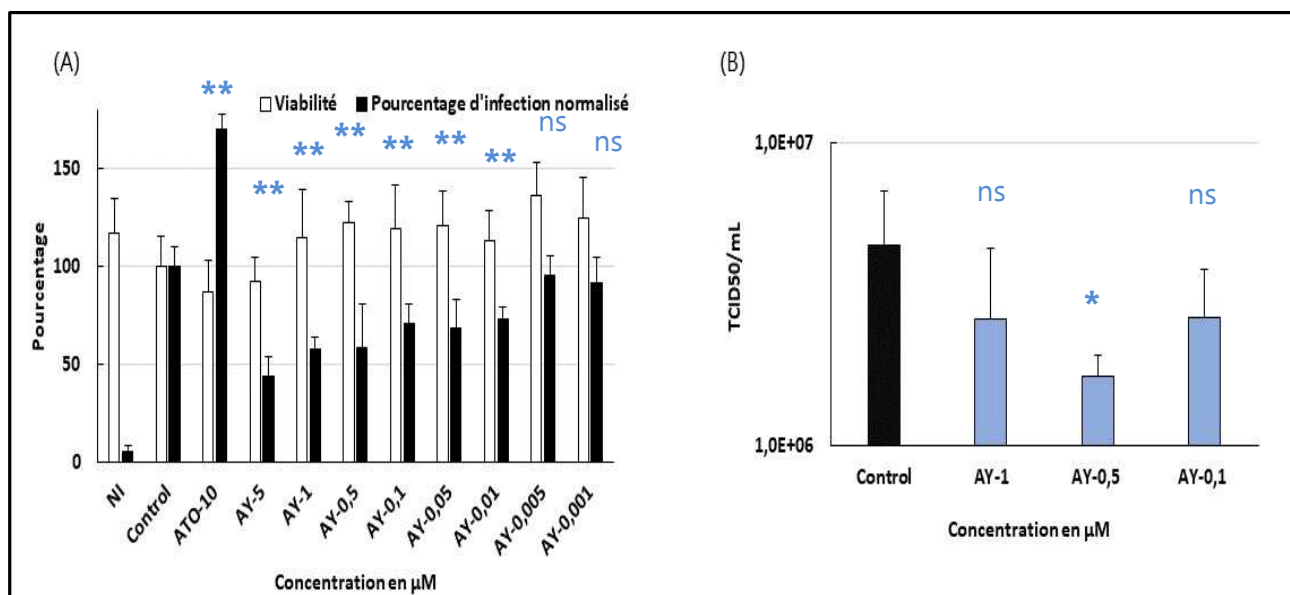


Figure 25 : **AY-9944 (inhibiteur de la synthèse du cholestérol) inhibe la réplication de WNV dans les eNPC.**

(A) Quantification par imagerie cellulaire automatisée

Contrôle : condition d'infection par WNV (MOI 0,1). ATO-10 : Témoin effet proviral de ATO à 10 μM .
AY-9944 : effet-dose de 5 à 0,001

(B) Quantification par TCID50 du nombre de particules virales infectieuses dans les surnageants

Contrôle : condition infection par WNV (MOI 0,1). ATO-10 : Témoin effet proviral de ATO à 10 μM .
Expression des résultats : moyenne +/- écart-type. Analyse statistique test de Mann-Whitney sur GraphPad Prism v9 *p-value < 0,05 ; **p-value < 0,01 ; ns non significatif. 2 expériences ont été réalisées.

2.2. Mécanisme d'action des statines dans les hNPC infectées par WNV

Le résultat inattendu sur les eNPC, à savoir un effet proviral, nous avait conduit à étudier l'effet des statines sur les hNPC infectées par WNV. Nous avons mis en évidence un effet antiviral (Figure 7 de l'article), opposé à celui observé dans les eNPC, que nous avons cherché à caractériser en parallèle. Là aussi, nous avons cherché à déterminer à quelle(s) étape(s) du cycle viral les statines exerçaient leur action puis, avec la même approche que sur les eNPC, nous avons cherché à déterminer si la voie du mévalonate était impliquée.

2.2.1. Etape(s) du cycle viral ciblée(s) par les statines dans les hNPC

Nous avons utilisé le schéma expérimental présenté figure 18 et nous avons reproduit l'expérience avec ATO et FLU à 10 μM . Pour rappel, les conditions présentées dans la figure 18 sont :

- Condition 1 : « en continu »,
- Condition 2 : en pré-traitement

- Condition 3 : pendant la phase d'adsorption uniquement
- Condition 4 : après la phase d'adsorption uniquement.

Nos résultats montrent (Figure 26 A et D) que les statines FLU et ATO n'ont pas d'impact sur la viabilité des cellules, cependant l'infection a un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules. La viabilité des cellules, en condition non infectées (NI) est respectivement pour ces 2 expériences FLU et ATO de $151,0 \pm 10,9$ et $156,6 \pm 8,0$ % de cellules.

FLU n'exerce pas un effet antiviral de sur les cellules, lorsqu'elle est ajoutée lors de la phase de prétraitement (2) et pendant la phase d'adsorption (3). Nous avons alors des pourcentages d'infection de $83,6 \pm 14,6$ % et $75 \pm 22,8$ % (Figure 26 A). Ces résultats sont non significatifs. L'effet antiviral de FLU se manifeste en condition (4) c'est-à-dire en ajout post infection, pendant la phase d'incubation. $44,5 \pm 10,0$ % des cellules sont infectées. Nous reproduisons alors, l'effet antiviral obtenu en condition continu (1) avec : $36,9 \pm 2,9$ % de cellules infectées. Ces résultats sont confirmés par la quantification des ARN viraux dans les surnageants (Figure 26 B). La quantification des particules virales infectieuses présentes (Figure 26 C) montre que celles-ci sont légèrement diminuées, sans toutefois que le seuil de fiabilité statistique ne soit atteint.

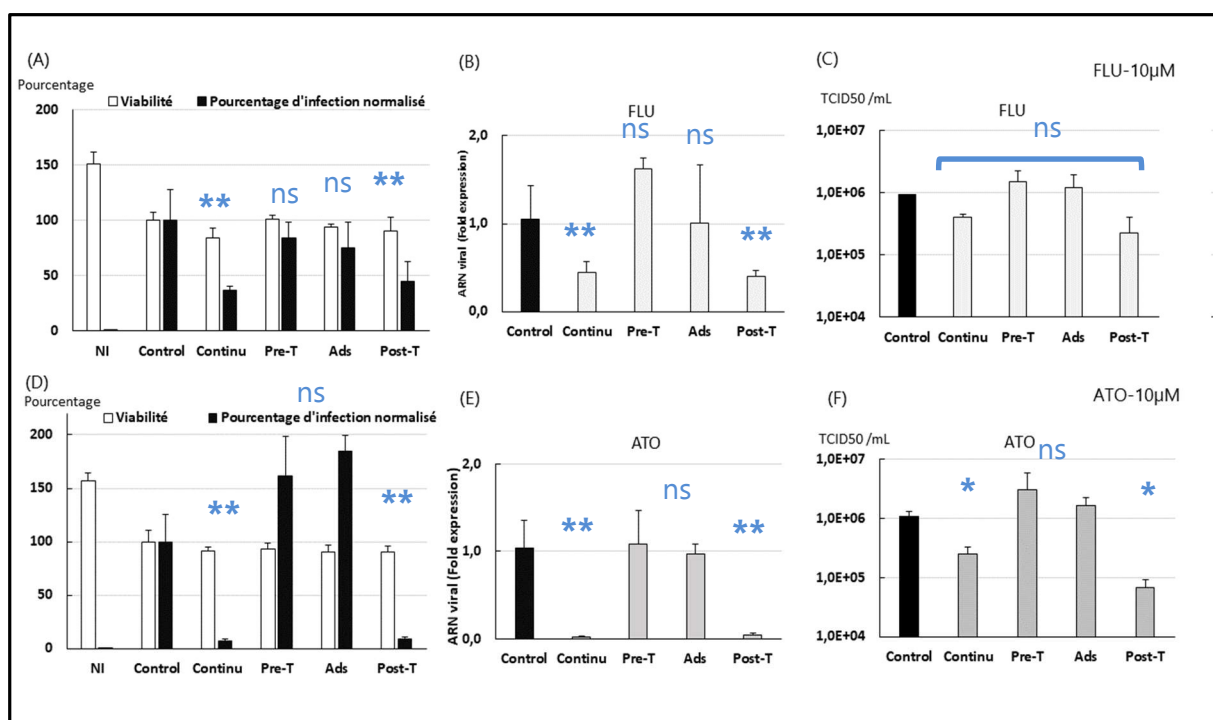


Figure 26 : **Atorvastatine (ATO) et Fluvastatine (FLU) exercent un effet antiviral dans les hNPC après la phase d'adsorption du virus**

Continu : ATO et FLU ajoutés en continu. **Pre-T** : ATO et FLU ajoutés en pré-traitement : condition (2) ; **Ads** : ATO et FLU ajoutés pendant l'adsorption : condition (3) ; **Post-T** : ATO et FLU ajoutés pendant la phase d'incubation condition (4) ; Ajout de Atorvastatine ATO : (D) (E) (F) ; Ajout de Fluvastatine FLU : (A) (B) (C). Quantification - de l'infection par imagerie : (A) et (D) ; - des ARN viraux dans les surnageants (B) et (E) ; - des particules virales infectieuses dans les surnageants (C) et (F). Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle (Condition d'infection (1) sans ajout de molécule) pour (A) (B) (D) (E) ; expression moyenne +/- écart-type. Analyse statistique test de Mann-Whitney sur GraphPad Prism v9 *p-value < 0,05 ; **p-value < 0,01 ; ns non significatif. 3 expériences indépendantes ont été réalisées.

Pour ATO, paradoxalement nous mettons en évidence, un effet proviral en imagerie dans les conditions (2) et (3) avec respectivement $161,4 \pm 37,4 \%$ et $184,5 \pm 15,3 \%$ de cellules infectées (Figure 26 D). Cet effet proviral n'est toutefois pas confirmé par la quantification des ARN viraux et des particules virales dans les surnageants (Figure 26 E et F). Cependant, comme attendu, nous confirmons l'effet antiviral d'ATO ($10 \mu\text{M}$) dans la condition (1) avec uniquement $6,6 \pm 2,3 \%$ des cellules infectées. Nous constatons que cet effet antiviral se retrouve en condition (4), lorsque ATO est ajoutée post-adsorption avec $8,9 \pm 1,4 \%$ des cellules infectées. L'effet antiviral exercé par ATO sur les hNPC infectées par WNV est confirmé par la quantification des ARN viraux dans les surnageants (Figure 26 E). Nous observons également une diminution de la quantité de particules virales infectieuses (Figure 26 F).

Nos résultats montrent que l'effet antiviral de fluvastatine et atorvastatine à $10 \mu\text{M}$ n'est pas dû à une activité des statines sur les cellules en amont de l'infection (2). De même, lorsque FLU est ajoutée lors de l'adsorption (3), il ne semble pas avoir d'effet sur les cellules et/ou le virus. L'effet proviral quantifié en imagerie avec ATO en condition (2) et (3) n'est pas confirmé par les autres techniques de quantification de l'infection. Il s'agit d'un artéfact. Nous constatons l'effet antiviral lorsque la statine est ajoutée post adsorption pendant la période d'incubation, au cours de laquelle le virus se réplique. Cela montre que les statines agissent entre la phase d'entrée et de sortie du virus, l'étape ou les étapes précises restant à déterminer.

Nous avons ensuite voulu préciser l'étape ou les étapes du cycle viral ciblée(s), en réalisant une étude de « time of addition assay » plus précise. Nous avons utilisé le schéma expérimental présenté Figure 19. Lors de travaux précédents, il a été montré que le cycle viral de WNV dans les hNPC est similaire à celui décrit classiquement dans les cellules de mammifères (Figure 21).

Nous avons donc ajouté les molécules 1h, 3h, 6h, 9h et 12h PI et nous avons réalisé cette expérience de « time of drug addition assay », à une MOI élevée ($\text{MOI} = 1$) pour laquelle 99% de cellules sont infectées en 24 h. Toujours pour les mêmes raisons pratiques évoqués dans la partie eNPC, nous avons stoppé l'expérience 20h PI.

Sur les hNPC, cette expérience de « Time of Drug Addition Assay » (Figure 27) ne nous a pas permis de mettre en évidence l'étape du cycle viral impactée par les statines, l'effet antiviral n'ayant pas été reproduit dans les contrôles. Cette expérience devra être complétée par la quantification des ARN viraux et particules virales infectieuses dans les surnageants et devra être répétée avant de tirer des conclusions.

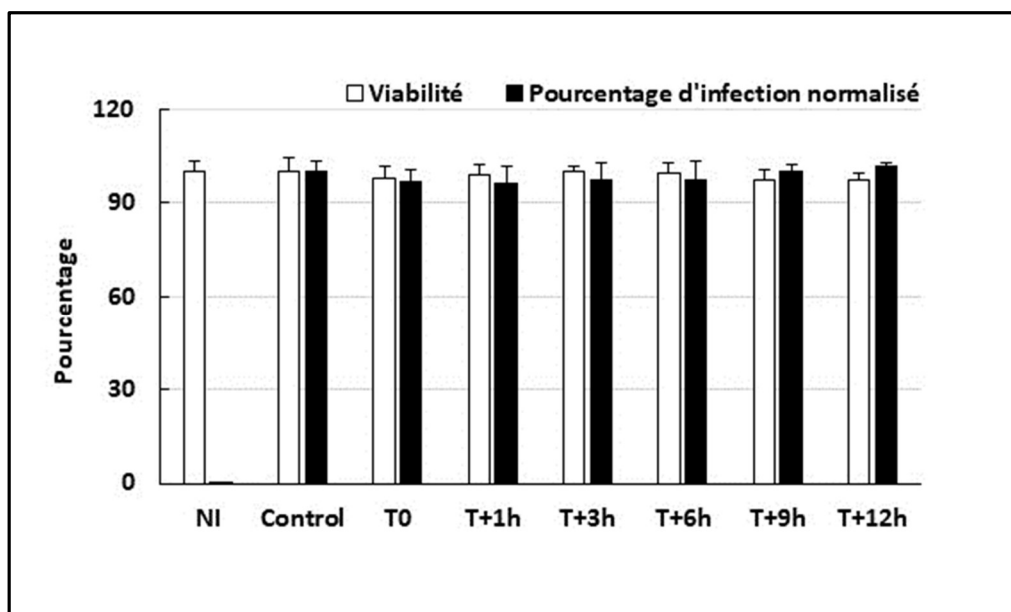


Figure 27 : **Quantification par imagerie cellulaire automatisée du Time of Drug Addition Assay** ATO 10 μ M. Le contrôle correspond à la condition d'infection par WNV (MOI 1) sans ajout de statines. Expression des résultats : moyenne +/- écart-type. Une seule expérience a été réalisée.

2.2.2. L'effet antiviral des statines est-il médié par une inhibition de synthèse du cholestérol ?

L'activité des statines est principalement d'inhiber la synthèse du cholestérol dans les cellules. Nous avons déjà évoqué ce point dans la partie eNPC. Afin de déterminer si l'effet antiviral des statines dans les hNPC est médié par une diminution du taux de cholestérol, nous avons également pris l'approche pharmacologique citée plus haut et réalisé des expériences en présence d'AY-9944 à différentes concentrations (Figure 28). Comme précédemment, nous avons choisi de poursuivre cette partie du travail uniquement avec l'atorvastatine, les expériences précédentes suggérant des mécanismes d'action similaires pour fluvastatine et atorvastatine,

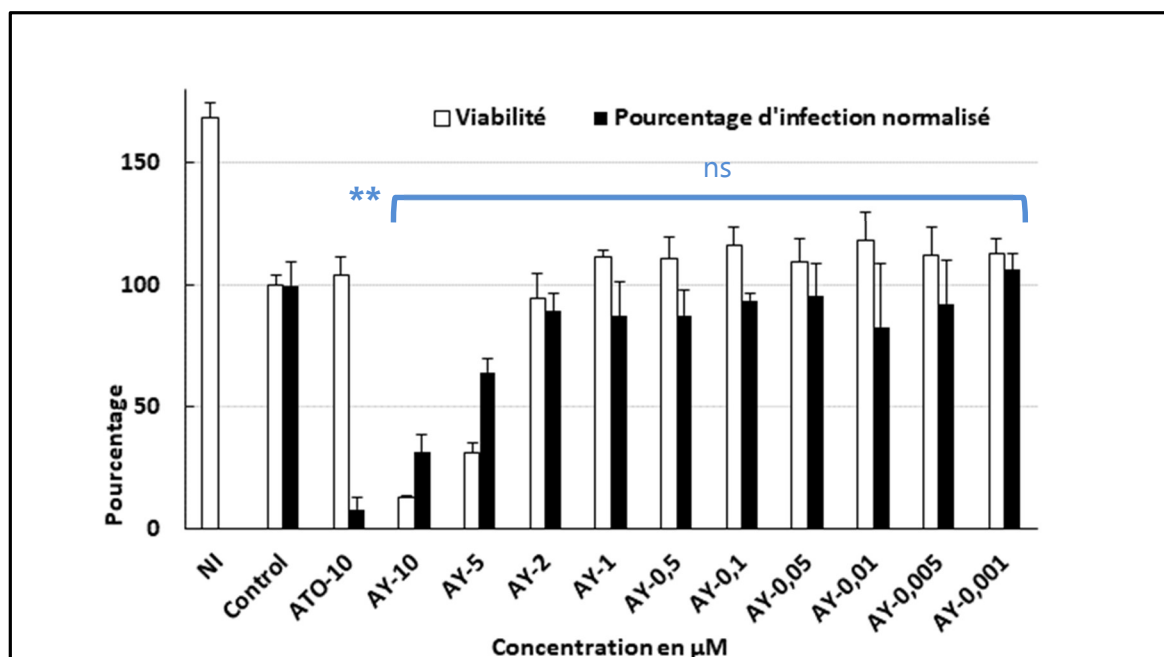


Figure 28 : **AY-9944 (inhibiteur de la synthèse du cholestérol) est sans effet sur la réplication de WNV dans les hNPC. Quantification par imagerie cellulaire automatisée**

Contrôle : condition d'infection par WNV (MOI 0,1). ATO-10 : Témoin effet antiviral de ATO à 10 μM .

AY-9944 (AY) : effet-dose de 5 à 0,001 μM

Expression des résultats : moyenne $\pm$ écart-type. Analyse statistique test de Mann-Whitney sur GraphPad Prism v9 **p-value < 0,01 ; ns non significatif- Deux expériences indépendantes ont été réalisées.

La quantification par imagerie cellulaire révèle, un puissant effet antiviral d'ATO à 10 μM dans les hNPC ($8,2 \pm 4,5$ % des cellules infectées). Cependant, nous observons une forte cytotoxicité de AY-9944 à des concentrations supérieures ou égales à 5 μM qui n'était pas observée dans les eNPC. Ceci montre que les hNPC sont plus sensibles à ce composé que leurs équivalentes équines. Par ailleurs, alors qu'un fort effet antiviral était observé dans les eNPC à 1 μM , un effet antiviral de AY-9944 n'est observé dans les hNPC que lorsque le composé est utilisé à 5 μM ou plus, une concentration à laquelle il est aussi fortement toxique. A ce stade, ces résultats ne permettent pas d'apporter des précisions quant au mécanisme d'action antiviral des statines dans les hNPC et quant au rôle du cholestérol. Ils pourront être validés par la quantification des ARN viraux et des particules virales infectieuses dans les surnageants.

2.3. Conclusion

Nous disposons de 2 modèles d'infection de cellules progénitrices neurales, l'un équin, l'autre humain, pour WNV.

Nous obtenons des résultats opposés. Sur le modèle équin, nous avons mis en évidence un effet proviral des statines : atorvastatine, fluvastatine, lovastatine et simvastatine. Cet effet cible probablement, l'étape d'assemblage des particules virales au cours du cycle de réplication de WNV dans la cellule. Atorvastatine et fluvastatine

ont un mécanisme d'action similaire. L'origine de cet effet proviral n'est pas élucidé mais il ne semble pas lié à l'effet hypocholestérolémiant des statines. En effet, l'ajout de AY-9944, inhibiteur de la synthèse du cholestérol, induit un effet antiviral sur les eNPC infectées par WNV.

Sur le modèle humain, nous avons mis en évidence un effet antiviral de ATO avec 90 % d'inhibition de l'infection. FLU et LOVA ont également un effet antiviral, mais moins important. Cet effet cible également une étape du cycle viral de WNV dans la cellule.

Nous avons des résultats opposés sur des modèles cellulaires du système nerveux de différentes espèces. Ceci illustre parfaitement le choix crucial du modèle cellulaire d'étude et les réserves à émettre sur les résultats obtenus applicables uniquement à l'espèce considérée. Il est pertinent de développer des modèles spécifiques d'espèces et de tissus et de tester les molécules antivirales sur le modèle considéré.

3. Infection des eNPC par le virus de l'encéphalite équine de l'est (EEEV)

Le virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV) est un virus neurotrope zoonotique sévissant en Amérique du Nord. Il n'existe actuellement aucun modèle d'infection spécifique du cerveau des chevaux. Afin de mettre en place un tel modèle, nous avons cherché à évaluer la permissivité des eNPC à la souche : NCPV689, souche H178/99 ; ICTV 0407041 (99.8 % ID avec KX000089.1 souche CV) de EEEV.

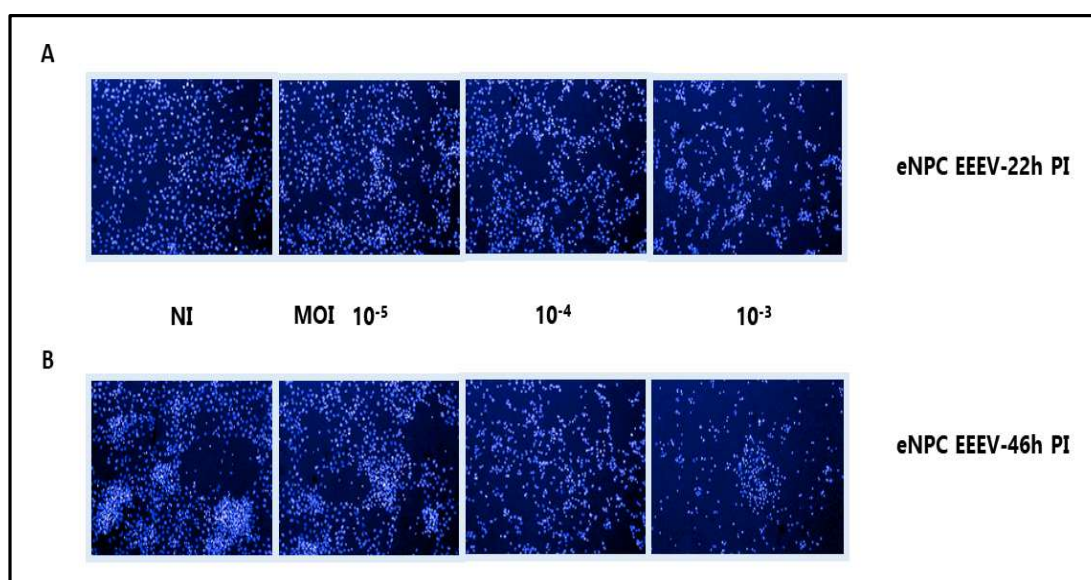


Figure 29 : EEEV a un effet cytopathique sur les eNPC.

A : 22h post infection et (B) : 46h post infection. : Photos grossissement x10 (Opera Phenix Perking Elmer) marquage au DAPI des noyaux. Conditions : NI =non infecté, MOI, 10^{-5} 10^{-4} , et 10^{-3} .

fort effet cytopathique dose-dépendant (Figure 29) ce qui démontre leur permissivité. Ceci a été confirmé par quantification du nombre de cellules survivantes par imagerie automatisée (Figure 30). Celle-ci confirme l'impact dramatique du virus sur les eNPC (80 % des cellules sont mortes aux MOI 1, 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} 46h après l'infection).

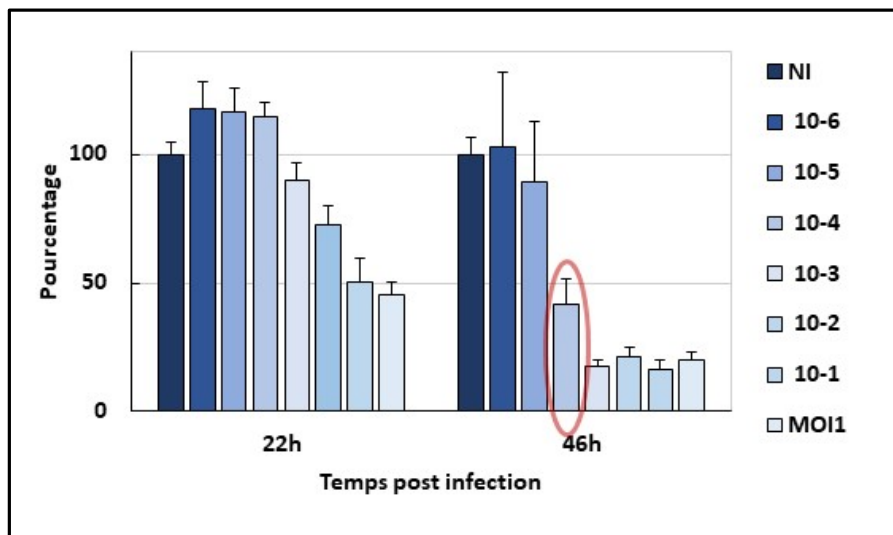


Figure 30. **Les eNPC sont permissives à EEEV**

Pourcentage de cellules survivantes normalisé quantifié par imagerie cellulaire automatisée (Opera Phenix-Pasteur) pour chaque temps par rapport au témoin : cellules non infectées. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition control (Condition d'infection sans ajout de molécule). Expression des résultats : moyenne +/- écart-type. - Deux expériences indépendantes ont été réalisées.

Un marquage en immunofluorescence indirecte (Figure 31) à l'aide d'un anticorps dirigé contre la nucléocapside de EEEV (SVF-C) confirme que les cellules sont infectées avec une localisation cytoplasmique de l'infection. Il révèle le fort effet cytopathique du virus sur les cellules dès 22h PI à la MOI de 10^{-4} .

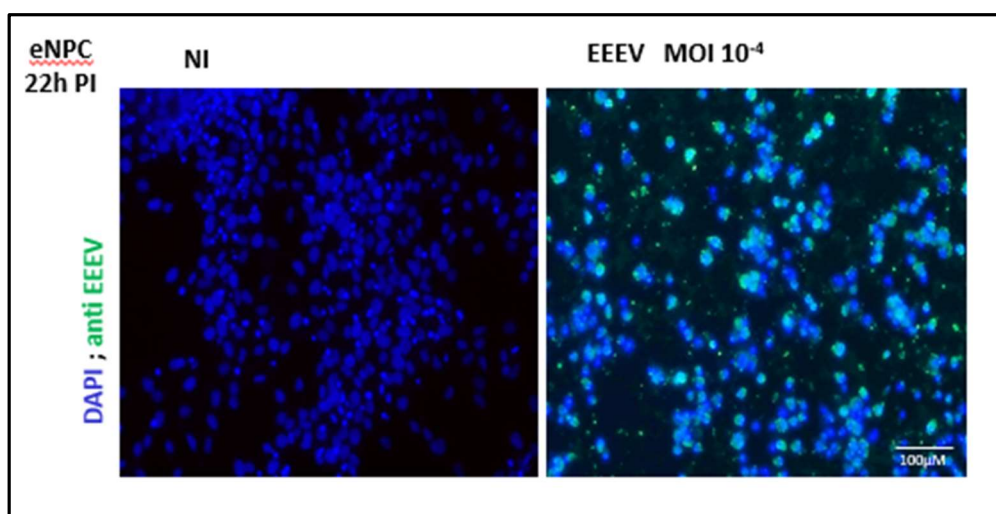


Figure 31 : **L'effet cytopathique de EEEV sur les eNPC.** Grossissement x20 Zeiss Axio observer Z1

A MOI 10^{-4} , nous sommes dans des conditions intéressantes pour un criblage de molécules. A savoir, nous avons ^{1/} un effet cytopathique important, ^{2/} un écart important entre condition témoin cellules non infectées et condition cellules infectées et ^{3/} compte tenu de la virulence de ce virus et de sa pathogénicité, une dose de virus minimale à manipuler.

Les résultats obtenus en imagerie restent à contrôler par quantification des ARN viraux et des particules virales infectieuses dans les surnageants de culture. Pour ce point, compte tenu de la pathogénicité de EEEV, nous opterons préférentiellement pour un contrôle par quantification des ARN viraux dans les surnageants.

Ces résultats montrent que les eNPC sont non seulement permissives à un *Flavivirus*, WNV, mais aussi à un *Alphavirus*, EEEV. Notre travail fournit ainsi un nouveau modèle d'infection spécifique du cerveau des équidés qui pourrait être utilisé dans le cadre de futures études visant à évaluer le potentiel de molécules antivirales contre ce Virus.

IV- Discussion Générale

Le virus West Nile est un arbovirus neurotrope à l'origine d'encéphalites virales chez le cheval et chez l'Homme. Ces infections peuvent être asymptomatiques ou entraîner des encéphalites mortelles ou de graves séquelles neurologiques. Le virus West Nile, identifié en 1937, a longtemps été très discret et peu étendu géographiquement en Europe et sur le bassin méditerranéen. En France, la première épidémie est recensée dans le sud, dans les années 60. Il circule à bas bruit, jusqu'à la fin des années 1990, les épidémies deviennent alors plus sévères et plus nombreuses. Les années 2000, marquent une entrée dans un cycle d'épidémies saisonnières annuelles pour la France. Au début des années 2010, le virus s'étend en Europe, avec une intensification des épidémies et une flambée de cas certaines années : 2015, 2018 et récemment 2022. Ce virus se caractérise maintenant par des saisons de transmission intenses avec un profil imprévisible et en constante évolution. Aucune thérapeutique antivirale n'est disponible pour le cheval (ni pour l'Homme). Il est donc primordial d'identifier des molécules efficaces contre ce virus dans un contexte où la couverture vaccinale est faible, notamment en France.

1. Les cellules du cerveau de cheval

Il n'y a que très peu d'études sur les infections à West Nile chez le cheval. Elles reposent surtout sur des coupes histologiques de cerveau *post-mortem* réalisées à la suite d'une infection neuroinvasive. La genèse d'iPSC équine, en permettant l'obtention de cellules du système nerveux central, offre maintenant une nouvelle alternative.

Le choix d'un modèle d'infection est important pour l'identification d'antiviraux. L'objectif est d'approcher le modèle qui va mimer la pathologie, telle qu'elle est observée *in vivo*. Pour cela, il faut travailler sur des cellules du tissu et de l'espèce cible de façon à respecter le tropisme du virus pour mimer la pathologie et le processus d'infection dans le tissu.

En montrant que les cellules progénitrices neurales équines (eNPC) sont permissives au WNV, nous avons développé un nouveau modèle d'infection intéressant par rapport à notre sujet : trouver des antiviraux pour traiter les formes neuroinvasives de WNV chez le cheval. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence des molécules dotées d'une activité antivirale : 2-C'-méthylcytidine, arbidol et ribavirine.

1.1. Les conditions de culture

Sensibles à leur environnement, les eNPC demandent un apport régulier en milieu frais, supplémenté en facteurs de croissance. Elles nécessitent un *coating* des supports de culture en poly-L-ornithine/laminine, long à mettre en place par rapport à un *coating* en matrigel. Ce dernier s'est avéré inapproprié pour les eNPC qui se regroupaient alors en amas. La culture des eNPC est donc chronophage et cela a ralenti

la planification des expériences. De plus, la différenciation des eNPC, si elle a permis d'obtenir des neurones, n'a pas été optimale dans la mesure où un fond important de cellules progénitrices est maintenu dans la culture et que des astrocytes ne sont vraisemblablement pas générés. De plus, les eNPC en cours de différenciation se rassemblent en amas et le processus s'accompagne d'une mortalité cellulaire importante. Dans ces conditions, il est impossible d'envisager une quantification par imagerie cellulaire et une caractérisation plus fine des cellules. Compte tenu de la présence des progéniteurs, les résultats seraient difficiles à interpréter et à attribuer aux neurones. Enfin, nous avons montré qu'une faible proportion de ces neurones sont infectés par WNV, le virus infectant essentiellement les progéniteurs dans ces cultures mixtes. *In vivo*, les cellules majoritairement infectées étant les neurones, nous sommes ainsi éloignés du modèle pathologique.

Nos résultats sur la différenciation sont assez similaires à ceux présentés par un groupe australien [145] qui décrivait un modèle d'infection de neurones corticaux dérivés d'iPCS équines, permissifs au WNV et au MVEV. Ils montraient une réplication des virus avec une augmentation du titre viral au cours du temps. Dans leur modèle, les cellules différenciées sont également rassemblées en amas, ce point peut s'avérer limitant pour l'étude du tropisme d'un virus. Depuis, aucune étude exploitant ce modèle n'a été publiée.

1.2. Un modèle physiologiquement pertinent ?

Les eNPC dérivées d'iPSC constituent un modèle en deux dimensions (2D). Ce modèle apporte des informations spécifiques à l'équin mais l'environnement est différent par rapport à un tissu *in vivo*, organisé en trois dimensions (3D). Des études ultérieures utilisant des organoïdes cérébraux équins ou « minibrain » qui offrent un environnement en 3D pourraient être réalisées. Les premiers travaux sur les organoïdes cérébraux sont attribués à Lancaster *et al.* en 2013 [218] et les organoïdes équins sont actuellement en cours de développement et de caractérisation dans l'équipe du Dr Bertrand PAIN à Lyon. Bien qu'exempt de vascularisation et ne reproduisant pas la BHE, ils pourraient permettre de retrouver approximativement la complexité du tissu cible.

Actuellement les cellules « différenciées » que j'ai obtenues lors de ce travail de thèse ne constituent pas un environnement optimal pour étudier les formes neuroinvasives de WNV chez l'équin, c'est à dire évaluer le tropisme du virus et ensuite tester le potentiel antiviral de molécules. Il faudrait améliorer le protocole de différenciation ou voir s'il est possible d'enrichir les cultures en neurones en triant les cellules. Il serait alors possible de réaliser une première sélection de molécules sur progéniteurs puis de tester sur les cellules différenciées, les molécules intéressantes et les molécules cytotoxiques déjà pressenties sur d'autres modèles d'après la littérature. Les neurones présents dans nos cultures étaient peu permissifs au WNV, sur ce point, l'environnement est peut-être en cause et l'enrichissement pourrait peut-être apporter une amélioration. L'utilisation des organoïdes cérébraux, constitués de différents sous-

types neuronaux dont certains pourraient être plus permissifs, pourrait être une autre option. Il serait intéressant de consacrer du temps à ces deux approches.

2. Le crible

Le modèle *in vitro* que nous avons mis en place, les eNPC infectées par le WNV, permet de cribler de petites banques de molécules (de l'ordre de 40 molécules). Les conditions de culture difficiles, associées à un taux de prolifération limité des cellules, ne permettent cependant pas d'envisager le développement de crible à plus haut débit.

Notre modèle d'infection par WNV spécifique de l'équin a révélé trois molécules avec une activité antivirale. Le 2'-CMC, un analogue de nucléosides, est un DAA se démarquant pour son effet antiviral sans toxicité pour la cellule. La ribavirine, un autre analogue de nucléotides, présente une cytotoxicité pour les eNPC, tout comme l'arbidol, un HTA inhibiteur de l'entrée du virus. Le sofosbuvir et le favipiravir sont deux molécules préalablement décrites dans la littérature pour avoir un effet inhibiteur sur WNV. Dans les eNPC, ces deux molécules se sont révélées non cytotoxiques mais sans effet antiviral (quantification par imagerie cellulaire et titrage du virus par TCID50). Certaines molécules également pressenties dans la littérature se sont avérées toxiques. C'est le cas de l'acide mycophénolique (AMP), du bréquinar, des inhibiteurs de cyclophilines (F83233 et F83233RS) et de la gemcitabine. Les eNPC sont apparues particulièrement sensibles à de nombreuses molécules. Ce point pourrait traduire une sensibilité particulière par rapport à des cellules neuronales différenciées, c'est un phénomène que nous avons déjà constaté en testant l'activité antivirale de molécules sur des cellules humaines (progénitrices versus leurs dérivés différenciées).

3-Les statines

3.1. Un effet proviral ?

Dans les eNPC, nous avons mis en évidence un effet facilitateur des statines sur la réplication du WNV. Ce résultat, nous a incité à chercher si cet effet était lié à l'espèce ou au type cellulaire. Nous avons appliqué notre protocole sur des cellules de provenances différentes : des A549 (lignée d'épithélium pulmonaire humain), des VERO (lignée simienne), et les hNPC (cellules progénitrices neurales humaines). L'effet proviral sur les eNPC se manifeste avec les 4 statines testées, fluvastatine, simvastatine, lovastatine et atorvastatine. Au contraire, ces mêmes statines, à l'exception de la simvastatine ont un effet antiviral sur les hNPC et pour la fluvastatine sur A549 et VERO. L'effet proviral ne semble donc pas spécifique des progéniteurs neuraux puisqu'il n'est pas retrouvé avec les progéniteurs neuraux humains. Nous mettons en évidence un effet antiviral ou une absence d'effet dans les autres types cellulaires. Cela semble d'ailleurs cohérent avec la littérature qui mentionne surtout un effet antiviral des statines. Elles sont pressenties comme des antiviraux pan-*Flavivirus* ou même, à spectre plus large [217]. Il nous reste donc à poursuivre nos investigations sur l'espèce équine pour voir si cet effet proviral est spécifique de l'espèce équine ou des cellules neurales équines.

Pour cela, il nous faudrait tester l'effet des statines sur l'infection par WNV d'autres cellules équine, telle que les cellules de derme équin (ED) et sur d'autres cellules du SNC équin. Nous pourrions comparer avec d'autres cellules neurales progénitrices équines dérivées d'iPSC, ou tester sur des organoïdes. Il faudrait peut-être, également s'assurer que ces progéniteurs soient proches et notamment capables de se différencier avec les mêmes caractéristiques. Cette spécificité pourrait être en lien avec le stade de différenciation. Pour exemple, les travaux de Sharma *et al.* (2014) conduisent à une différenciation en motoneurons et celle de Fortuna *et al.* (2018) en neurones corticaux [143], [145]. Nos résultats montrent combien les résultats de criblage de molécules sont dépendants du type cellulaire et de l'espèce.

3.2 L'aspect mécanistique

Nous avons souhaité comprendre le mécanisme d'action des statines sur le cycle viral de WNV dans les eNPC. L'expérience des temps d'ajout de ATO ou FLU nous a permis d'écarter un effet sur la cellule. L'ajout de la statine pendant la phase de prétraitement n'a, en effet, pas de répercussion sur l'infection. De même, pendant l'adsorption en présence du virus, les statines n'ont pas d'effet sur les cellules et/ou le virus entraînant l'effet proviral (Figure 20). Nos expériences montrent que les statines agissent entre les phases d'entrée et de sortie du virus. Elles sont décrites pour avoir un effet hypocholestérolémiant en agissant sur l'HMGCoA réductase. L'inhibition de cette enzyme conduit à un défaut de synthèse *de novo* en cholestérol qui est indispensable lors de plusieurs phases du cycle viral. Il s'ensuit un effet antiviral. L'effet proviral dans les eNPC pourrait être expliqué par un manque d'affinité des statines pour l'HMGCoA réductase équine et par conséquent par une absence de modulation du taux de cholestérol cellulaire ou encore par une activation de l'enzyme au lieu de son inhibition ce qui entraînerait une augmentation du taux de cholestérol et l'effet facilitateur de la réplication que nous observons.

Nous avons mis en évidence que l'effet proviral s'exerce au cours du cycle de réplication du virus dans la cellule. Une ou des étapes de ce cycle de réplication sont affectée(s). L'expérience du TOA (20h) montre que les étapes du cycle viral sont impactées entre 3 h et 9 h PI, c'est-à-dire en cours de l'assemblage des particules virales semble-t-il (Figure 23). Au-delà de 9 h PI, c'est-à-dire lors de la maturation des particules virales et de leurs sorties de la cellule, il n'y a plus d'impact. Ces résultats suggèrent un effet *enhancer* sur les étapes tardives du cycle viral, telle que l'assemblage des particules virales. Dès 20 h, en imagerie, nous détectons un nombre important de cellules infectées. Il faudrait refaire l'expérience et quantifier les particules virales et les ARN viraux présents dans les surnageants, ainsi que les ARN viraux dans les cellules pour nous aider dans notre interprétation.

Les connaissances du cycle viral et des spécificités d'action des statines sur la cellule et le cycle viral ne permettent pas d'expliquer le phénomène proviral, les données de la littérature orientent vers des effets antiviraux. Ainsi, la synthèse *de novo* du cholestérol ne semble pas nécessaire pour la réplication de l'ARN viral [206],

[207]. L'infection par le WNV entraîne une relocalisation du cholestérol de la membrane plasmique au niveau du site de réplication (complexe réplicatif) et de l'enzyme HMGCoA réductase qui se relocalise avec les protéines virales [85] pour faciliter la réplication des ARN viraux et l'assemblage des particules. Medigeschi dans son étude de 2008 montre que lors d'une infection par WNV NY-99, il n'y a pas surexpression du gène *hmgcr* (gène de la hydroxy-méthyl-glutarylcoenzyme-A reductase) [84]. Ce qui suggère pour cette souche de WNV que le taux de HMGCoA réductase présent dans la cellule est suffisant, donc peut-être non limitant.

L'ajout de AY-9944, un inhibiteur de la voie de synthèse du cholestérol agissant sur la dernière étape induit un effet antiviral. Ces résultats démontrent que l'effet proviral induit par les statines dans les eNPC n'est pas lié à une inhibition de la synthèse de cholestérol. Ce résultat sera à confirmer avec un autre inhibiteur : l'acide zaragozique A qui inhibe la synthèse du squalène, une étape en amont sur la voie de synthèse du cholestérol (Figure 32). Nous pourrions également quantifier le cholestérol dans les eNPC et contrôler l'impact de l'infection et des molécules sur celle-ci. Nous ne savons pas si l'inhibition de la voie de synthèse du cholestérol est aussi efficace et comparable avec les statines et le AY-9944.

3.3. Quelles autres pistes pour expliquer l'effet proviral des statines dans les eNPC ?

Les statines en inhibant l'HMGCoA réductase diminuent également la synthèse de composés tels que le coenzyme Q, le dolichol, les isopentenyl tRNA et des intermédiaires des isoprénoïdes tels que le geranylgeranylpyrophosphate et le farnesylpyrophosphate. La voie de synthèse du mévalonate est détaillée à la figure 32. Les statines diminuent ainsi la prénylation et la farnésylation de protéines GTPases : les protéines G telles que Rho, Rac, Ras, Rab et Cdc42. Il s'agit de modifications post-traductionnelles des protéines G, l'ajout de groupements lipidiques géranylgéranyl ou farnésyl permet leur adressage à la membrane plasmique. Ces GTPases sont ensuite impliquées, en tant que facteur déclenchant dans différentes cascades de signalisation. Elles peuvent ainsi affecter différentes voies de transduction du signal dans les cellules. Des expériences utilisant des composés pharmacologiques tels que GGTI-286 [208], [209] et FFTI-277 [209], respectivement des inhibiteurs spécifiques de la prénylation et de la farnésylation des protéines, permettraient d'identifier si l'effet proviral est une conséquence d'un défaut de prénylation ou de farnésylation des protéines. Ces deux composés sont utilisés classiquement pour confirmer si l'effet antiviral des statines est lié à un défaut de prénylation ou farnésylation des protéines cellulaires de type GTPases, impliquées par exemple dans le cas du HCV et du HIV dans la réplication des ARN viraux. Un défaut de farnésylation de Ras et de prénylation de Rac conduit à une sous-expression de molécules pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-8, IFN-1 β , TNF- α . Cela pourrait contribuer à freiner la réponse cellulaire à l'infection [203]. La réponse inflammatoire pourrait ne pas être suffisante pour déclencher les mécanismes pour réprimer la réplication du virus. Ces expériences pourraient nous orienter. Il est possible

que cet effet proviral soit une résultante d'un effet des statines sur la seconde branche de la voie de synthèse du mévalonate avec d'une inactivation de Protéine G par défaut de prénylation ou farnésylation.

Les travaux de Blanchet *et al.* (2016) suggèrent une piste pour expliquer un autre mécanisme d'action par lequel l'effet proviral des statines pourrait s'exercer dans les eNPC [219]. En effet, ils montrent une régulation positive du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (low density lipoprotein receptor, LDLr) dans des cellules Huh7.5 après addition des statines (FLU, SIM, LOVA, ATO), avec pour effet, une facilitation sur l'entrée du HCV. Ils confirment également un effet inhibiteur sur la réplication du génome viral. A noter, que dans leur étude, la pravastatine exercerait un effet proviral sur l'entrée du HCV, mis en évidence lors d'expériences de courtes durées. Les auteurs suggèrent d'ailleurs une vigilance par rapport à l'utilisation de la pravastatine sur des patients infectés par le HCV. Gorabi *et al.* (2020) évoque le risque de réactivation de virus latent, notamment pour HBV avec l'atorvastatine en raison du rôle immunomodulateur possible des statines [217].

Nous pouvons supposer que le WNV échapperait à la réponse immunitaire dans les eNPC. Les statines ont un effet pléiotrope sur différentes voies de signalisation cellulaire, associées à l'environnement dans la cellule, au type cellulaire, il est possible de concevoir qu'une combinaison de facteurs puisse entraîner un effet proviral. Dans notre cas, l'effet proviral est suffisamment élevé et s'exerce sur une étape du cycle viral sans être associé à un effet antiviral à une autre étape. Il nous manque des éléments de réponse.

Notre résultat n'est pas un cas isolé. Une recherche bibliographique permet d'identifier quelques publications présentant des effets proviraux de molécules. Des articles portent sur des molécules classiquement testées comme antiviraux. C'est le cas notamment de l'acide mycophénolique (MPA) qui a un effet proviral sur HBV à 1 µg/mL mais un effet antiviral à 5-10 µg/mL sur HepG2 [220]. Il y a donc une mise en garde par rapport à l'utilisation du MPA lors de transplantations hépatiques pour éviter les rejets d'organes. Des inhibiteurs de la synthèse des pyrimidines : le leflunomide et le FK778 sont connus pour leur effet antiviral sur HCMV et human polyomavirus BK (BKV). Le leflunomide a également un effet antiviral sur HIV, RSV, HSV-1. Il a été montré par des expériences de *silencing* de l'expression de p38 que leflunomide, FK778 et MPA peuvent, à l'inverse, avoir un effet proviral sur HBV, lié à leur effet activateur de la phosphorylation de p38 [221].

3.3. L'effet antiviral des statines sur hNPC

Nous avons constaté sur les hNPC, un effet antiviral très fort de ATO, 90 % d'inhibition. Cet effet antiviral s'exerce au cours du cycle de réplication du WNV dans la cellule (Figure 26). Le TOA (20h) ne nous a pas permis d'affiner au niveau du cycle viral, pour localiser l'étape ou les étapes ciblées. De même, nous constatons, une absence d'effet antiviral de AY-9944. Cela pourrait être dû à une absence de rôle ou à

un rôle mineur du cholestérol dans le cycle viral de WNV sur ces cellules. Une absence d'entrée du composé dans les hNPC pourrait également être en cause. Ces deux phénomènes expliqueraient un manque d'effet sur la quantité de cholestérol dans les hNPC. Comme pour les eNPC, nous pourrions quantifier le cholestérol dans ces cellules pour évaluer le pouvoir hypocholestérolémiant des statines et du AY-9944 afin d'apporter des éléments de réponses. Nous pourrions également tester l'autre inhibiteur de la voie de synthèse du cholestérol, évoqué dans le paragraphe sur les eNPC, pour ne pas écarter trop hâtivement ce mode d'action. Nous compléterons également, en parallèle par des expériences avec les inhibiteurs de la prénylation et de la farnésylation des protéines.

Etudier l'effet antiviral des statines, sur les hNPC infectées par WNV, permettrait également de mieux comprendre les mécanismes d'infection du WNV (de l'entrée dans la cellule à la libération des particules) et les interactions hôtes/virus. Pour avoir une vue d'ensemble de l'effet des statines sur les infections WNV dans les cellules neurales progénitrices, équine et humaine, une approche globale en RNA-seq pourrait apporter des pistes ; le cholestérol étant décrit comme important dans le cycle réplicatif du WNV.

4. Perspectives

Nous pourrions tester un certain nombre de molécules non testées sur notre modèle mais décrites pour avoir un effet antiviral sur WNV : ivermectine, remdesivir et lycorine qui ont été citées en introduction dans le chapitre 4. Dans sa revue de 2018, Sinigaglia évoque des molécules testées pouvant être intéressantes, et notamment le zafirlukast, une molécule déjà approuvée par la FDA pour le traitement de l'asthme décrite pour inhiber la protéase NS2B-NS3 [153], [222]. Ce serait un exemple de repositionnement thérapeutique. Il cite également l'association d'un siRNA anti-Flavi ciblant une région hautement conservée du gène de la protéine E et d'un peptide (RVG9R) dérivé de la glycoprotéine du virus de la rage. Ce peptide se lie spécifiquement au récepteur de l'acétylcholine exprimé par les cellules neuronales. Différentes voies d'administration ont été testées : intraveineuse, intracrânienne, nasale et ont induit une réponse immunitaire protégeant les souris infectées par JEV ou WNV des formes mortelles voire d'une réinfection [223]. Ces résultats semblent prometteurs.

Cependant, dans leur revue respective, Sinigaglia *et al.* (2020) et Tommaso *et al.* (2020) font le même constat : NS3 et NS5, ainsi que leur activité enzymatique sont les cibles sur lesquelles les recherches d'antiviraux (DAA) doivent se concentrer [68], [153]. D'autant que leur structure et leur fonction sont conservées chez les *Flavivirus* et permettraient ainsi d'identifier des antiviraux pan-Flavi.

Il ne faut pas négliger les travaux visant à identifier des HTA, dans la mesure où cibler la cellule offre une ouverture vers du pan-viral. Cela oriente plus vers l'identification d'une ou de molécules à large spectre, ou de viser un repositionnement de molécules Et s'affranchir en partie des recherches, des essais cliniques longs et coûteux, qui n'aboutissent pas toujours à une commercialisation.

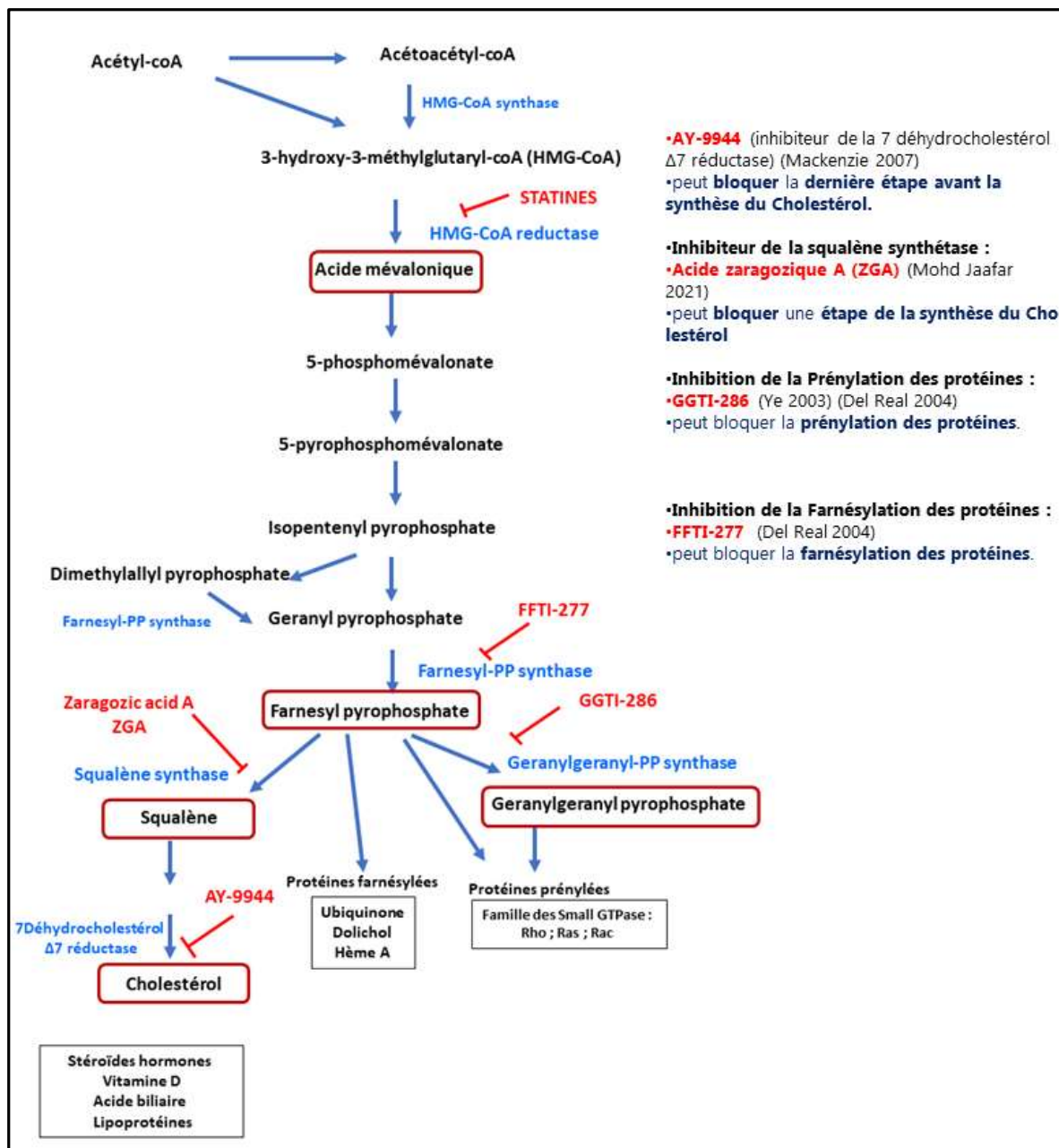


Figure 32 : **Action des inhibiteurs sur la voie de synthèse de l'acide mévalonique** [85], [208]-[210]

Nous avons évoqué le modèle *in vitro* en 3D, les organoïdes cérébraux. Ils apportent une dimension supplémentaire par rapport à la culture cellulaire « 2D ». Cependant, la vascularisation fait défaut et cela peut être un facteur important, dans le cas de l'étude de la forme neuroinvasive de WNV et la recherche d'antiviraux. Il n'est pas, non plus, possible de recueillir des informations sur le franchissement de la BHE. En revanche, il est possible d'avoir des informations sur le tropisme cellulaire du virus et les mécanismes d'infection. Pour autant, il faut avoir une bonne caractérisation des organoïdes : s'agit-il de neurones moteurs ou corticaux et si un environnement en astrocytes et cellules de la microglie est reproduit ? Ensuite, est-il facile d'analyser l'intérieur de ces structures ?

Les organoïdes étant longs à obtenir, ils pourraient être utilisés en complément pour tester des molécules présélectionnées, en vue d'identifier des antiviraux. Ils donnent l'information de l'effet sur le virus et de la molécule sur l'infection dans un environnement complexe. Cependant, cela reste du *in vitro* et la transposition au *in vivo* n'est toujours pas assurée. Seules les études *in vivo* peuvent apporter des connaissances des mécanismes cellulaires pour l'acheminement de la molécule, dans l'organisme.

Les progéniteurs neuraux équins que nous avons générés pourraient être intéressants pour étudier d'autres encéphalites virales équines. Nous avons effectivement montré que ces cellules sont permissives au EEEV et nous pourrions poursuivre le développement de ce modèle. Nous pourrions envisager de développer d'autres modèles d'infection, en commençant, par exemple, par tester leur permissivité à d'autres virus qui ont un tropisme pour le SNC équin, comme l'herpesvirus équin [150] ou le virus de l'encéphalite japonaise [143].

5. Conclusion générale

Ces travaux démontrent combien le choix du modèle d'étude est important. Ces modèles peuvent avoir une sensibilité différente à la molécule et faire passer à côté d'une toxicité pour le tissu ou l'espèce animale visée. Pour un virus donné et une molécule donnée, un effet antiviral sur une lignée cellulaire peut ne pas être identique sur d'autres modèles. Il est facile à concevoir qu'un modèle proche physiologiquement est plus pertinent.

Le modèle d'infection de cellules neurales équines par WNV que nous avons développé est un modèle *in vitro* qui se rapproche des cellules spécifiques du tissu et de l'espèce impactées par la pathologie. C'est un outil critique et précieux dans le contexte des 3R de l'éthique en expérimentation animale, à savoir : remplacer l'utilisation d'animaux par d'autres méthodes expérimentales, réduire le nombre d'animaux utilisés pour les expériences, « raffiner » ou améliorer les procédures expérimentales pour réduire la souffrance des animaux dans nos approches.

En effet, nous l'avons évoqué dans l'introduction, les études *in vivo* des formes neuroinvasives de WNV sur la souris qui ne développe pas de signe clinique après une infection naturelle semblent peu pertinentes. De même, les souris « KO » sont établies pour éteindre un facteur dans un tissu spécifiquement étudié. Dans la mesure où ce facteur sera également éteint dans tout l'organisme, cela peut être un point critique. Le modèle équin quant à lui, est lourd à mettre en place au niveau de la logistique. Il demande des structures adaptées, de niveau de sécurité biologique 3 pour la manipulation de pathogènes tels que WNV. Le coût est élevé. Il est envisageable uniquement en étape finale, sur un petit nombre d'animaux, pour confirmer ou infirmer la ou les molécules préalablement sélectionnées.

Disposer de telles molécules, permettrait d'avoir une réaction plus rapide et peut-être endiguer plus rapidement les épidémies. Dans ce contexte d'émergence de virus, avec le WNV en exemple, nous pouvons concevoir qu'un certain nombre d'arbovirus neurotropes cités dans l'introduction, pourraient gagner l'Europe. Sans être aussi pessimiste, les 3 premiers cas équins d'infection WNV ont été mis en évidence en Nouvelle-Aquitaine en 2022. C'est une région avec des zones marécageuses où le moustique peut vite se multiplier et devenir envahissant. Potentiellement, cette région pourrait, au même titre que la Camargue, connaître des foyers saisonniers de WNV avec des cas humains et équins, puisque que c'est également une zone avec une forte activité de la filière équine.

L'ensemble des résultats présentés rappelle également l'importance majeure d'une recherche forte pour la découverte d'antiviraux à large spectre, et l'importance de considérer la santé animale et humaine dans un contexte « Une seule santé – One Health ». En effet nos travaux initialement concentrés sur l'équin se sont orientés, guidés par nos résultats vers l'humain. Ils ont soulevé des questions et il devenait évident, que nous devons faire un parallèle, une comparaison entre ces deux espèces.

V- Valorisation du travail de thèse

Posters

> XXIII^e Journées Francophones de Virologies PARIS - XXIII^e JFV 04/2021

Identification de molécules antivirales contre le virus West-Nile par une approche combinant l'imagerie cellulaire et les cellules neurales équine dérivées de cellules souches pluripotentes induites.

> Journées scientifiques et doctorales de l'Anses ; MAISONS-ALFORT ; JSDA 10/2021

Identification of antiviral molecules against West-Nile virus by an approach combining cell imaging and equine neural cells derived from induced-pluripotent stem cells.

> Journées scientifiques du département de santé animale INRAE-ANGLET-JSA 10 /2022

Identification de molécules favorisant ou inhibant la réplication du virus West Nile dans des cellules neurales équine.

> XXI^e Journée de l'école doctorale 569 ; Université PARIS-SACLAY ; JED 06/2022

Identification de molécules antivirales contre le virus West-Nile par une approche combinant l'imagerie cellulaire et les cellules neurales équine dérivées de cellules souches pluripotentes induites.

Présentations orales

> 11th International Equine Infectious Diseases Conference ; IEIDC ; 09/2021 (10min)

Identification of antiviral molecules against West Nile virus by an approach combining cell imaging and equine neural cells derived from induced pluripotent stem cells.

> Journée de la Recherche EnvA ; MAISONS-ALFORT ; 09/2022 (3 min)

Identification of antiviral molecules: Importance of the choice of cell model.

> Journées scientifiques et doctorales de l'Anses ; MAISONS-ALFORT ; JSDA ; 10/2022 (3min)

Unexpected proviral activity identified for a family of molecules in West Nile virus-infected equine neural cells.

VII- Bibliographie

- [1] P. Tritz, A. Leblond, S. Pronost, M. Culpier, M. Levy, et S. Lecollinet, « Diagnostic différentiel épidémio-clinique et de laboratoire des affections nerveuses d'origine infectieuse », *Le point vétérinaire*, p. 9, 2014.
- [2] S. Lecollinet *et al.*, « Viral Equine Encephalitis, a Growing Threat to the Horse Population in Europe? », *Viruses*, vol. 12, n° 1, p. 23, déc. 2019, doi: 10.3390/v12010023.
- [3] G. E. Chapman, M. Baylis, D. Archer, et J. M. Daly, « The challenges posed by equine arboviruses », *Equine Vet J*, vol. 50, n° 4, p. 436-445, juill. 2018, doi: 10.1111/evj.12829.
- [4] S. R. Azar, R. K. Campos, N. A. Bergren, V. N. Camargos, et S. L. Rossi, « Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks », *Microorganisms*, vol. 8, n° 8, p. 1167, août 2020, doi: 10.3390/microorganisms8081167.
- [5] Z. R. Stromberg, W. Fischer, S. B. Bradfute, J. Z. Kubicek-Sutherland, et P. Hraber, « Vaccine Advances against Venezuelan, Eastern, and Western Equine Encephalitis Viruses », *Vaccines*, vol. 8, n° 2, p. 273, juin 2020, doi: 10.3390/vaccines8020273.
- [6] E. Gould, J. Pettersson, S. Higgs, R. Charrel, et X. de Lamballerie, « Emerging arboviruses: Why today? », *One Health*, vol. 4, p. 1-13, déc. 2017, doi: 10.1016/j.onehlt.2017.06.001.
- [7] C. Bahuon *et al.*, « West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks: -EN- -FR- Épizootie due au virus de West Nile survenue en Camargue (France) en 2015 et renforcement des réseaux de surveillance et de contrôle -ES- Epizootia causada por el virus West Nile en la Camarga (Francia) en 2015 y refuerzo de las redes de vigilancia y control », *Rev. Sci. Tech. OIE*, vol. 35, n° 3, p. 811-824, déc. 2016, doi: 10.20506/rst.35.3.2571.
- [8] C. Beck *et al.*, « Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease », *IJERPH*, vol. 10, n° 11, p. 6049-6083, nov. 2013, doi: 10.3390/ijerph10116049.
- [9] G. Habarugira, W. W. Suen, J. Hobson-Peters, R. A. Hall, et H. Bielefeldt-Ohmann, « West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and "One Health" Implications », *Pathogens*, vol. 9, n° 7, p. 589, juill. 2020, doi: 10.3390/pathogens9070589.
- [10] M. Y. Chowers *et al.*, « Clinical Characteristics of the West Nile Fever Outbreak, Israel, 2000 », *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 7, n° 4, p. 675-678, août 2001, doi: 10.3201/eid0704.017414.
- [11] M. S. Diamond, « Progress on the development of therapeutics against West Nile virus », *Antiviral Research*, vol. 83, n° 3, p. 214-227, sept. 2009, doi: 10.1016/j.antiviral.2009.05.006.
- [12] U. Ziegler *et al.*, « West Nile virus epizootic in Germany, 2018 », *Antiviral Research*, vol. 162, p. 39-43, févr. 2019, doi: 10.1016/j.antiviral.2018.12.005.
- [13] M. A. H. Braks, J. W. Duijster, et C. A. J. Stroo, « [West Nile virus unexpectedly in the Netherlands] », *Ned Tijdschr Geneesk*, vol. 166, p. D6278, mars 2022.
- [14] K. C. Smithburn, T. P. Hughes, A. W. Burke, et J. H. Paul, « A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda », *Yellow Fever Research Institute, Entebbe, Uganda*, p. Volume s1-20: Issue 4 p471-492, 11 juin 1940.
- [15] A. Rizzoli *et al.*, « The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities », *Euro Surveill*, vol. 20, n° 20, p. 21135, mai 2015, doi: 10.2807/1560-7917.es2015.20.20.21135.
- [16] K. N. Pesko et G. D. Ebel, « West Nile virus population genetics and evolution », *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 12, n° 2, p. 181-190, mars 2012, doi: 10.1016/j.meegid.2011.11.014.

- [17] C. Beck *et al.*, « Contrasted Epidemiological Patterns of West Nile Virus Lineages 1 and 2 Infections in France from 2015 to 2019 », *Pathogens*, vol. 9, n° 11, p. 908, oct. 2020, doi: 10.3390/pathogens9110908.
- [18] T. Bakonyi *et al.*, « Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe », *Emerg Infect Dis*, vol. 12, n° 4, p. 618-623, avr. 2006, doi: 10.3201/eid1204.051379.
- [19] A. Papa *et al.*, « Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010 », *Euro Surveill*, vol. 15, n° 34, p. 19644, août 2010, doi: 10.2807/ese.15.34.19644-en.
- [20] A. Vazquez *et al.*, « Putative new lineage of west nile virus, Spain », *Emerg Infect Dis*, vol. 16, n° 3, p. 549-552, mars 2010, doi: 10.3201/eid1603.091033.
- [21] G. Fall, C. Loucoubar, M. Diallo, A. A. Sall, et O. Faye, « Vector Competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for Lineages 1, 2, Koutango and a Putative New Lineage of West Nile Virus », *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 90, n° 4, p. 747-754, avr. 2014, doi: 10.4269/ajtmh.13-0405.
- [22] K. Pachler, K. Lebl, D. Berer, I. Rudolf, Z. Hubalek, et N. Nowotny, « Putative New West Nile Virus Lineage in *Uranotaenia unguiculata* Mosquitoes, Austria, 2013 », *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 20, n° 12, p. 2119-2122, déc. 2014, doi: 10.3201/eid2012.140921.
- [23] E. M. Botha *et al.*, « Genetic Determinants of Virulence in Pathogenic Lineage 2 West Nile Virus Strains », *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, n° 2, 2008.
- [24] T. C. Pierson et M. S. Diamond, « The continued threat of emerging flaviviruses », *Nat Microbiol*, vol. 5, n° 6, p. 796-812, mai 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0714-0.
- [25] M. S. Diamond, T. C. Pierson, et D. H. Fremont, « The structural immunology of antibody protection against West Nile virus », *Immunological Reviews*, vol. 225, n° 1, p. 212-225, oct. 2008, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00676.x.
- [26] G. Speight, G. Coia, M. D. Parker, et E. G. Westaway, « Gene Mapping and Positive Identification of the Non-structural Proteins NS2A, NS2B, NS3, NS4B and NS5 of the Flavivirus Kunjin and Their Cleavage Sites », *Journal of General Virology*, vol. 69, n° 1, p. 23-34, janv. 1988, doi: 10.1099/0022-1317-69-1-23.
- [27] T. Nowak, P. M. Färber, G. Wengler, et G. Wengler, « Analyses of the terminal sequences of west nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis », *Virology*, vol. 169, n° 2, p. 365-376, avr. 1989, doi: 10.1016/0042-6822(89)90162-1.
- [28] A. A. Khromykh, H. Meka, K. J. Guyatt, et E. G. Westaway, « Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication », *J Virol*, vol. 75, n° 14, p. 6719-6728, juill. 2001, doi: 10.1128/JVI.75.14.6719-6728.2001.
- [29] C. Polacek, J. E. Foley, et E. Harris, « Conformational changes in the solution structure of the dengue virus 5' end in the presence and absence of the 3' untranslated region », *J Virol*, vol. 83, n° 2, p. 1161-1166, janv. 2009, doi: 10.1128/JVI.01362-08.
- [30] W.-W. Chiu, R. M. Kinney, et T. W. Dreher, « Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome », *J Virol*, vol. 79, n° 13, p. 8303-8315, juill. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.13.8303-8315.2005.
- [31] K. Clyde et E. Harris, « RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication », *J Virol*, vol. 80, n° 5, p. 2170-2182, mars 2006, doi: 10.1128/JVI.80.5.2170-2182.2006.
- [32] P. Y. Shi, M. A. Brinton, J. M. Veal, Y. Y. Zhong, et W. D. Wilson, « Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA », *Biochemistry*, vol. 35, n° 13, p. 4222-4230, avr. 1996, doi: 10.1021/bi952398v.
- [33] P. Y. Shi, W. Li, et M. A. Brinton, « Cell proteins bind specifically to West Nile virus minus-strand 3' stem-loop RNA », *J Virol*, vol. 70, n° 9, p. 6278-6287, sept. 1996, doi: 10.1128/JVI.70.9.6278-6287.1996.

- [34] C. Thurner, C. Witwer, I. L. Hofacker, et P. F. Stadler, « Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes », *J Gen Virol*, vol. 85, n° Pt 5, p. 1113-1124, mai 2004, doi: 10.1099/vir.0.19462-0.
- [35] B. D. Lindenbach, H.-J. Thiel, et C. M. Rice, « Flaviviridae: The Viruses and Their Replication », p. 52, 2006.
- [36] T. Kimura et A. Ohyama, « Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion », *J Gen Virol*, vol. 69 (Pt 6), p. 1247-1254, juin 1988, doi: 10.1099/0022-1317-69-6-1247.
- [37] M. S. Suthar, M. S. Diamond, et M. Gale Jr, « West Nile virus infection and immunity », *Nat Rev Microbiol*, vol. 11, n° 2, p. 115-128, févr. 2013, doi: 10.1038/nrmicro2950.
- [38] S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn, et M. G. Rossmann, « A structural perspective of the flavivirus life cycle », *Nat Rev Microbiol*, vol. 3, n° 1, p. 13-22, janv. 2005, doi: 10.1038/nrmicro1067.
- [39] T. C. Pierson et M. Kielian, « Flaviviruses: braking the entering », *Current Opinion in Virology*, vol. 3, n° 1, p. 3-12, févr. 2013, doi: 10.1016/j.coviro.2012.12.001.
- [40] J. Smit, B. Moesker, I. Rodenhuis-Zybert, et J. Wilschut, « Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion », *Viruses*, vol. 3, n° 2, p. 160-171, févr. 2011, doi: 10.3390/v3020160.
- [41] S. Mukhopadhyay, B.-S. Kim, P. R. Chipman, M. G. Rossmann, et R. J. Kuhn, « Structure of West Nile virus », *Science*, vol. 302, n° 5643, p. 248, oct. 2003, doi: 10.1126/science.1089316.
- [42] G. E. Nybakken, C. A. Nelson, B. R. Chen, M. S. Diamond, et D. H. Fremont, « Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein », *J Virol*, vol. 80, n° 23, p. 11467-11474, déc. 2006, doi: 10.1128/JVI.01125-06.
- [43] R. Kanai *et al.*, « Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes », *J Virol*, vol. 80, n° 22, p. 11000-11008, nov. 2006, doi: 10.1128/JVI.01735-06.
- [44] E. Konishi et P. W. Mason, « Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein », *J Virol*, vol. 67, n° 3, p. 1672-1675, mars 1993, doi: 10.1128/JVI.67.3.1672-1675.1993.
- [45] I. C. Lorenz, S. L. Allison, F. X. Heinz, et A. Helenius, « Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum », *J Virol*, vol. 76, n° 11, p. 5480-5491, juin 2002, doi: 10.1128/jvi.76.11.5480-5491.2002.
- [46] K. Stadler, S. L. Allison, J. Schlich, et F. X. Heinz, « Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin », *J Virol*, vol. 71, n° 11, p. 8475-8481, nov. 1997, doi: 10.1128/JVI.71.11.8475-8481.1997.
- [47] M. Brinton, « Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus », *Viruses*, vol. 6, n° 1, p. 13-53, déc. 2013, doi: 10.3390/v6010013.
- [48] M. Rastogi, N. Sharma, et S. K. Singh, « Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein », *Virol J*, vol. 13, n° 1, p. 131, déc. 2016, doi: 10.1186/s12985-016-0590-7.
- [49] A. W. Wessel, M. P. Doyle, T. B. Engdahl, J. Rodriguez, J. E. Crowe, et M. S. Diamond, « Human Monoclonal Antibodies against NS1 Protein Protect against Lethal West Nile Virus Infection », *mBio*, vol. 12, n° 5, p. e02440-21, oct. 2021, doi: 10.1128/mBio.02440-21.
- [50] L. B. Young, E. B. Melian, et A. A. Khromykh, « NS1' colocalizes with NS1 and can substitute for NS1 in West Nile virus replication », *J Virol*, vol. 87, n° 16, p. 9384-9390, août 2013, doi: 10.1128/JVI.01101-13.
- [51] D. A. Muller et P. R. Young, « The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker », *Antiviral Research*, vol. 98, n° 2, p. 192-208, mai 2013, doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.008.
- [52] J. Y. Leung, G. P. Pijlman, N. Kondratieva, J. Hyde, J. M. Mackenzie, et A. A. Khromykh, « Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly », *J Virol*, vol. 82, n° 10, p. 4731-4741, mai 2008, doi: 10.1128/JVI.00002-08.
- [53] W. J. Liu, H. B. Chen, et A. A. Khromykh, « Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication », *J Virol*, vol. 77, n° 14, p. 7804-7813, juill. 2003, doi: 10.1128/jvi.77.14.7804-7813.2003.

- [54] J. M. Mackenzie, A. A. Khromykh, M. K. Jones, et E. G. Westaway, « Subcellular Localization and Some Biochemical Properties of the Flavivirus Kunjin Nonstructural Proteins NS2A and NS4A », *Virology*, vol. 245, n° 2, p. 203-215, juin 1998, doi: 10.1006/viro.1998.9156.
- [55] W. J. Liu, X. J. Wang, D. C. Clark, M. Lobigs, R. A. Hall, et A. A. Khromykh, « A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice », *J Virol*, vol. 80, n° 5, p. 2396-2404, mars 2006, doi: 10.1128/JVI.80.5.2396-2404.2006.
- [56] E. B. Melian, J. H. Edmonds, T. K. Nagasaki, E. Hinzman, N. Floden, et A. A. Khromykh, « West Nile virus NS2A protein facilitates virus-induced apoptosis independently of interferon response », *J Gen Virol*, vol. 94, n° Pt 2, p. 308-313, févr. 2013, doi: 10.1099/vir.0.047076-0.
- [57] L. Yu, K. Takeda, et L. Markoff, « Protein-protein interactions among West Nile non-structural proteins and transmembrane complex formation in mammalian cells », *Virology*, vol. 446, n° 1-2, p. 365-377, nov. 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.08.006.
- [58] S. Clum, K. E. Ebner, et R. Padmanabhan, « Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B », *J Biol Chem*, vol. 272, n° 49, p. 30715-30723, déc. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.49.30715.
- [59] S. A. Condotta, M. M. Martin, M. Boutin, et F. Jean, « Detection and in-cell selectivity profiling of the full-length West Nile virus NS2B/NS3 serine protease using membrane-anchored fluorescent substrates », *Biol Chem*, vol. 391, n° 5, p. 549-559, mai 2010, doi: 10.1515/BC.2010.051.
- [60] L. D. Kramer, J. Li, et P.-Y. Shi, « West Nile virus », *Lancet Neurol*, vol. 6, n° 2, p. 171-181, févr. 2007, doi: 10.1016/S1474-4422(07)70030-3.
- [61] C. Lin, S. M. Amberg, T. J. Chambers, et C. M. Rice, « Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site », *J Virol*, vol. 67, n° 4, p. 2327-2335, avr. 1993, doi: 10.1128/JVI.67.4.2327-2335.1993.
- [62] V. F. Yamshchikov et R. W. Compans, « Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study », *J Virol*, vol. 68, n° 9, p. 5765-5771, sept. 1994, doi: 10.1128/JVI.68.9.5765-5771.1994.
- [63] G. Wengler et G. Wengler, « The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity », *Virology*, vol. 197, n° 1, p. 265-273, nov. 1993, doi: 10.1006/viro.1993.1587.
- [64] M. J. Feito, J. Gómez-Gutiérrez, S. Ayora, J. C. Alonso, D. Peterson, et F. Gavilanes, « Insights into the oligomerization state-helicase activity relationship of West Nile virus NS3 NTPase/helicase », *Virus Res*, vol. 135, n° 1, p. 166-174, juill. 2008, doi: 10.1016/j.virusres.2008.03.008.
- [65] A. E. Gorbalenya, A. P. Donchenko, E. V. Koonin, et V. M. Blinov, « N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases », *Nucleic Acids Res*, vol. 17, n° 10, p. 3889-3897, mai 1989, doi: 10.1093/nar/17.10.3889.
- [66] E. Mastrangelo *et al.*, « Crystal Structure and Activity of Kunjin Virus NS3 Helicase; Protease and Helicase Domain Assembly in the Full Length NS3 Protein », *Journal of Molecular Biology*, vol. 372, n° 2, p. 444-455, sept. 2007, doi: 10.1016/j.jmb.2007.06.055.
- [67] M. P. Ramanathan *et al.*, « Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway », *Virology*, vol. 345, n° 1, p. 56-72, févr. 2006, doi: 10.1016/j.virol.2005.08.043.
- [68] T. Felicetti, G. Manfroni, V. Cecchetti, et R. Cannalire, « Broad-Spectrum Flavivirus Inhibitors: a Medicinal Chemistry Point of View », *ChemMedChem*, vol. 15, n° 24, p. 2391-2419, déc. 2020, doi: 10.1002/cmdc.202000464.
- [69] S. Miller, S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Bühler, et R. Bartenschlager, « The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in

- a 2K-regulated manner », *J Biol Chem*, vol. 282, n° 12, p. 8873-8882, mars 2007, doi: 10.1074/jbc.M609919200.
- [70] J. Roosendaal, E. G. Westaway, A. Khromykh, et J. M. Mackenzie, « Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein », *J Virol*, vol. 80, n° 9, p. 4623-4632, mai 2006, doi: 10.1128/JVI.80.9.4623-4632.2006.
- [71] G. Zou *et al.*, « A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor », *Virology*, vol. 384, n° 1, p. 242-252, févr. 2009, doi: 10.1016/j.virol.2008.11.003.
- [72] S. Miller, S. Sparacio, et R. Bartenschlager, « Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B », *J Biol Chem*, vol. 281, n° 13, p. 8854-8863, mars 2006, doi: 10.1074/jbc.M512697200.
- [73] Y. Zhou *et al.*, « Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase », *J Virol*, vol. 81, n° 8, p. 3891-3903, avr. 2007, doi: 10.1128/JVI.02704-06.
- [74] M.-P. Egloff, D. Benarroch, B. Selisko, J.-L. Romette, et B. Canard, « An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization », *EMBO J*, vol. 21, n° 11, p. 2757-2768, juin 2002, doi: 10.1093/emboj/21.11.2757.
- [75] Y. Zhao *et al.*, « Molecular basis for specific viral RNA recognition and 2'-O-ribose methylation by the dengue virus nonstructural protein 5 (NS5) », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 112, n° 48, p. 14834-14839, déc. 2015, doi: 10.1073/pnas.1514978112.
- [76] P. W. Chu et E. G. Westaway, « Characterization of Kunjin virus RNA-dependent RNA polymerase: reinitiation of synthesis in vitro », *Virology*, vol. 157, n° 2, p. 330-337, avr. 1987, doi: 10.1016/0042-6822(87)90275-3.
- [77] K. J. Guyatt, E. G. Westaway, et A. A. Khromykh, « Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin », *J Virol Methods*, vol. 92, n° 1, p. 37-44, mars 2001, doi: 10.1016/S0166-0934(00)00270-6.
- [78] S. Steffens, H.-J. Thiel, et S.-E. Behrens, « The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro », *J Gen Virol*, vol. 80 (Pt 10), p. 2583-2590, oct. 1999, doi: 10.1099/0022-1317-80-10-2583.
- [79] B. H. Tan, J. Fu, R. J. Sugrue, E. H. Yap, Y. C. Chan, et Y. H. Tan, « Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in Escherichia coli exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity », *Virology*, vol. 216, n° 2, p. 317-325, févr. 1996, doi: 10.1006/viro.1996.0067.
- [80] M. Laurent-Rolle *et al.*, « The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling », *J Virol*, vol. 84, n° 7, p. 3503-3515, avr. 2010, doi: 10.1128/JVI.01161-09.
- [81] K. J. Lubick *et al.*, « Flavivirus Antagonism of Type I Interferon Signaling Reveals Prolidase as a Regulator of IFNAR1 Surface Expression », *Cell Host Microbe*, vol. 18, n° 1, p. 61-74, juill. 2015, doi: 10.1016/j.chom.2015.06.007.
- [82] B. D. Lindenbach et C. M. Rice, « Molecular biology of flaviviruses », *Adv Virus Res*, vol. 59, p. 23-61, 2003, doi: 10.1016/S0065-3527(03)59002-9.
- [83] J. Smit, B. Moesker, I. Rodenhuis-Zybert, et J. Wilschut, « Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion », *Viruses*, vol. 3, n° 2, p. 160-171, févr. 2011, doi: 10.3390/v3020160.
- [84] G. R. Medigeshi, A. J. Hirsch, D. N. Streblow, J. Nikolich-Zugich, et J. A. Nelson, « West Nile Virus Entry Requires Cholesterol-Rich Membrane Microdomains and Is Independent of $\alpha\beta 3$ Integrin », *J Virol*, vol. 82, n° 11, p. 5212-5219, juin 2008, doi: 10.1128/JVI.00008-08.
- [85] J. M. Mackenzie, A. A. Khromykh, et R. G. Parton, « Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response », *Cell Host & Microbe*, vol. 2, n° 4, p. 229-239, oct. 2007, doi: 10.1016/j.chom.2007.09.003.
- [86] B. Murgue, S. Murri, H. Triki, V. Deubel, et H. G. Zeller, « West Nile in the Mediterranean Basin: 1950-2000 », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 951, n° 1, p. 117-126, janv. 2006, doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02690.x.

- [87] R. S. Lanciotti *et al.*, « Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States », *Science*, vol. 286, n° 5448, p. 2333-2337, déc. 1999, doi: 10.1126/science.286.5448.2333.
- [88] J. Hadfield *et al.*, « Twenty years of West Nile virus spread and evolution in the Americas visualized by Nextstrain », *PLoS Pathog*, vol. 15, n° 10, p. e1008042, oct. 2019, doi: 10.1371/journal.ppat.1008042.
- [89] N. Komar et G. G. Clark, « West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean », *Rev Panam Salud Publica*, vol. 19, n° 2, p. 112-117, févr. 2006, doi: 10.1590/S1020-49892006000200006.
- [90] D. Pervanidou *et al.*, « West Nile virus in humans, Greece, 2018: the largest seasonal number of cases, 9 years after its emergence in the country », *Eurosurveillance*, vol. 25, n° 32, août 2020, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.1900543.
- [91] S. C. Chaintoutis, A. Papa, D. Pervanidou, et C. I. Dovas, « Evolutionary dynamics of lineage 2 West Nile virus in Europe, 2004–2018: Phylogeny, selection pressure and phylogeography », *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 141, p. 106617, déc. 2019, doi: 10.1016/j.ympev.2019.106617.
- [92] J. Rappole, « Migratory Birds and Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere », *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 6, n° 4, p. 319-328, août 2000, doi: 10.3201/eid0604.000401.
- [93] N. Komar, « West Nile virus surveillance using sentinel birds », *Ann N Y Acad Sci*, vol. 951, p. 58-73, déc. 2001, doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb02685.x.
- [94] P. Calistri *et al.*, « Further spread of West Nile virus in Italy », *Vet Ital*, vol. 46, n° 4, p. 467-474, 2010.
- [95] L. Barzon *et al.*, « Early start of seasonal transmission and co-circulation of West Nile virus lineage 2 and a newly introduced lineage 1 strain, northern Italy, June 2022 », *Euro Surveill*, vol. 27, n° 29, p. 2200548, juill. 2022, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.29.2200548.
- [96] F. Riccardo *et al.*, « Rapid increase in neuroinvasive West Nile virus infections in humans, Italy, July 2022 », *Euro Surveill*, vol. 27, n° 36, p. 2200653, sept. 2022, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.36.2200653.
- [97] L. Fiacre, N. Pagès, E. Albina, J. Richardson, S. Lecollinet, et G. Gonzalez, « Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts », *IJMS*, vol. 21, n° 23, p. 9117, nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21239117.
- [98] E. R. Winkelmann, H. Luo, et T. Wang, « West Nile Virus Infection in the Central Nervous System », *F1000Res*, vol. 5, p. 105, janv. 2016, doi: 10.12688/f1000research.7404.1.
- [99] S. M. Lim, P. Koraka, A. D. M. E. Osterhaus, et B. E. E. Martina, « West Nile Virus: Immunity and Pathogenesis », *Viruses*, vol. 3, n° 6, p. 811-828, juin 2011, doi: 10.3390/v3060811.
- [100] O. A. Maximova et A. G. Pletnev, « Flaviviruses and the Central Nervous System: Revisiting Neuropathological Concepts », *Annu. Rev. Virol.*, vol. 5, n° 1, p. 255-272, sept. 2018, doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043439.
- [101] D. W. C. Beasley *et al.*, « Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains », *J Virol*, vol. 79, n° 13, p. 8339-8347, juill. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.13.8339-8347.2005.
- [102] M. A. Samuel, H. Wang, V. Siddharthan, J. D. Morrey, et M. S. Diamond, « Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, n° 43, p. 17140-17145, oct. 2007, doi: 10.1073/pnas.0705837104.
- [103] H. Wang, V. Siddharthan, J. O. Hall, et J. D. Morrey, « West Nile virus preferentially transports along motor neuron axons after sciatic nerve injection of hamsters », *J Neurovirol*, vol. 15, n° 4, p. 293-299, juill. 2009, doi: 10.1080/13550280902973978.
- [104] S. Verma *et al.*, « West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier », *Virology*, vol. 385, n° 2, p. 425-433, mars 2009, doi: 10.1016/j.virol.2008.11.047.

- [105] B. P. Daniels, D. W. Holman, L. Cruz-Orengo, H. Jujavarapu, D. M. Durrant, et R. S. Klein, « Viral Pathogen-Associated Molecular Patterns Regulate Blood-Brain Barrier Integrity via Competing Innate Cytokine Signals », *mBio*, vol. 5, n° 5, p. e01476-14, oct. 2014, doi: 10.1128/mBio.01476-14.
- [106] B. L. Fredericksen, « The neuroimmune response to West Nile virus », *J. Neurovirol.*, vol. 20, n° 2, p. 113-121, avr. 2014, doi: 10.1007/s13365-013-0180-z.
- [107] L. R. Petersen, A. C. Brault, et R. S. Nasci, « West Nile Virus: Review of the Literature », *JAMA*, vol. 310, n° 3, p. 308, juill. 2013, doi: 10.1001/jama.2013.8042.
- [108] R. Hasebe *et al.*, « Rterseaanrchsacrteicllelular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein », 2010.
- [109] S. Ayloo et C. Gu, « Transcytosis at the blood-brain barrier », *Curr Opin Neurobiol*, vol. 57, p. 32-38, août 2019, doi: 10.1016/j.conb.2018.12.014.
- [110] K. Roe, M. Kumar, S. Lum, B. Orillo, V. R. Nerurkar, et S. Verma, « West Nile virus-induced disruption of the blood–brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases », *Journal of General Virology*, vol. 93, n° 6, p. 1193-1203, juin 2012, doi: 10.1099/vir.0.040899-0.
- [111] M. Potokar, J. Jorgačevski, et R. Zorec, « Astrocytes in Flavivirus Infections », *Int J Mol Sci*, vol. 20, n° 3, p. E691, févr. 2019, doi: 10.3390/ijms20030691.
- [112] M. C.-J. Cheeran, S. Hu, W. S. Sheng, A. Rashid, P. K. Peterson, et J. R. Lokensgard, « Differential responses of human brain cells to West Nile virus infection », *J Neurovirol*, vol. 11, n° 6, p. 512-524, déc. 2005, doi: 10.1080/13550280500384982.
- [113] K. L. Hussmann, M. A. Samuel, K. S. Kim, M. S. Diamond, et B. L. Fredericksen, « Differential Replication of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of West Nile Virus within Astrocytes », *J Virol*, vol. 87, n° 5, p. 2814-2822, mars 2013, doi: 10.1128/JVI.02577-12.
- [114] L. de Vries et A. T. Harding, « Mechanisms of Neuroinvasion and Neuropathogenesis by Pathologic Flaviviruses », *Viruses*, vol. 15, n° 2, p. 261, janv. 2023, doi: 10.3390/v15020261.
- [115] S. Stonedahl, P. Clarke, et K. L. Tyler, « The Role of Microglia during West Nile Virus Infection of the Central Nervous System », *Vaccines (Basel)*, vol. 8, n° 3, p. E485, août 2020, doi: 10.3390/vaccines8030485.
- [116] R. S. Klein *et al.*, « Neuronal CXCL10 Directs CD8⁺ T-Cell Recruitment and Control of West Nile Virus Encephalitis », *J Virol*, vol. 79, n° 17, p. 11457-11466, sept. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.17.11457-11466.2005.
- [117] T. Wang, T. Town, L. Alexopoulou, J. F. Anderson, E. Fikrig, et R. A. Flavell, « Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis », *Nat Med*, vol. 10, n° 12, p. 1366-1373, déc. 2004, doi: 10.1038/nm1140.
- [118] T. Town, D. Jeng, L. Alexopoulou, J. Tan, et R. A. Flavell, « Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3 », *J Immunol*, vol. 176, n° 6, p. 3804-3812, mars 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.6.3804.
- [119] S. Daffis, M. A. Samuel, M. S. Suthar, M. Gale, et M. S. Diamond, « Toll-Like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection », *J Virol*, vol. 82, n° 21, p. 10349-10358, nov. 2008, doi: 10.1128/JVI.00935-08.
- [120] P. Wang *et al.*, « Caspase-12 controls West Nile virus infection via the viral RNA receptor RIG-I », *Nat Immunol*, vol. 11, n° 10, p. 912-919, oct. 2010, doi: 10.1038/ni.1933.
- [121] W. G. Glass, J. K. Lim, R. Cholera, A. G. Pletnev, J.-L. Gao, et P. M. Murphy, « Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection », *Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, n° 8, p. 1087-1098, oct. 2005, doi: 10.1084/jem.20042530.
- [122] W. Suen, N. Prow, R. Hall, et H. Bielefeldt-Ohmann, « Mechanism of West Nile Virus Neuroinvasion: A Critical Appraisal », *Viruses*, vol. 6, n° 7, p. 2796-2825, juill. 2014, doi: 10.3390/v6072796.

- [123] O. A. Maximova *et al.*, « Virus infection of the CNS disrupts the immune-neural-synaptic axis via induction of pleiotropic gene regulation of host responses », *eLife*, vol. 10, p. e62273, févr. 2021, doi: 10.7554/eLife.62273.
- [124] M. L. Dubbelaar, L. Kracht, B. J. L. Eggen, et E. W. G. M. Boddeke, « The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes », *Front Immunol*, vol. 9, p. 1753, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01753.
- [125] Y. M. Mustafá, L. M. Meuren, S. V. A. Coelho, et L. B. de Arruda, « Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System », *Front Microbiol*, vol. 10, p. 525, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00525.
- [126] J. Morrey *et al.*, « Efficacy of orally administered T-705 pyrazine analog on lethal West Nile virus infection in rodents », *Antiviral Research*, vol. 80, n° 3, p. 377-379, déc. 2008, doi: 10.1016/j.antiviral.2008.07.009.
- [127] K. Takahashi et S. Yamanaka, « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors », *Cell*, vol. 126, n° 4, p. 663-676, août 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [128] K. Takahashi *et al.*, « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors », *Cell*, vol. 131, n° 5, p. 861-872, nov. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [129] J. Yu *et al.*, « Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells », *Science*, vol. 318, p. 1917-20, déc. 2007, doi: 1151526 [pii] 10.1126/science.1151526.
- [130] M. Nakagawa *et al.*, « Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts », *Nat Biotechnol*, vol. 26, p. 101-6, janv. 2008, doi: nbt1374 [pii] 10.1038/nbt1374.
- [131] J. Nichols *et al.*, « Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 », *Cell*, vol. 95, n° 3, p. 379-391, oct. 1998, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81769-9.
- [132] A. A. Avilion, S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, et R. Lovell-Badge, « Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function », *Genes Dev*, vol. 17, n° 1, p. 126-140, janv. 2003, doi: 10.1101/gad.224503.
- [133] Y. Li, J. McClintick, L. Zhong, H. J. Edenberg, M. C. Yoder, et R. J. Chan, « Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4 », *Blood*, vol. 105, n° 2, p. 635-637, janv. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-07-2681.
- [134] A. C. Davis, M. Wims, G. D. Spotts, S. R. Hann, et A. Bradley, « A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice », *Genes Dev*, vol. 7, n° 4, p. 671-682, avr. 1993, doi: 10.1101/gad.7.4.671.
- [135] I. Chambers *et al.*, « Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells », *Cell*, vol. 113, n° 5, p. 643-655, mai 2003, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00392-1.
- [136] K. Mitsui *et al.*, « The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells », *Cell*, vol. 113, n° 5, p. 631-642, mai 2003, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00393-3.
- [137] M. Richards, S.-P. Tan, J.-H. Tan, W.-K. Chan, et A. Bongso, « The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE », *Stem Cells*, vol. 22, n° 1, p. 51-64, 2004, doi: 10.1634/stemcells.22-1-51.
- [138] T. Aasen *et al.*, « Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes », *Nat Biotechnol*, vol. 26, n° 11, p. 1276-1284, nov. 2008, doi: 10.1038/nbt.1503.
- [139] L. A. Williams, B. N. Davis-Dusenbery, et K. C. Eggan, « SnapShot: Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells », *Cell*, vol. 149, n° 5, p. 1174-1174.e1, mai 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.05.015.
- [140] M. A. M. Aboul-Soud, A. J. Alzahrani, et A. Mahmoud, « Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)—Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening », *Cells*, vol. 10, n° 9, p. 2319, sept. 2021, doi: 10.3390/cells10092319.

- [141] J. A. Depla *et al.*, « Human Brain Organoids as Models for Central Nervous System Viral Infection », *Viruses*, vol. 14, n° 3, p. 634, mars 2022, doi: 10.3390/v14030634.
- [142] K. Nagy *et al.*, « Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts », *Stem Cell Rev Rep*, vol. 7, n° 3, p. 693-702, sept. 2011, doi: 10.1007/s12015-011-9239-5.
- [143] R. Sharma *et al.*, « Generation of Functional Neurons from Feeder-Free, Keratinocyte-Derived Equine Induced Pluripotent Stem Cells », *Stem Cells and Development*, vol. 23, n° 13, p. 1524-1534, juill. 2014, doi: 10.1089/scd.2013.0565.
- [144] F. X. Donadeu et C. L. Esteves, « Prospects and Challenges of Induced Pluripotent Stem Cells in Equine Health », *Front. Vet. Sci.*, vol. 2, nov. 2015, doi: 10.3389/fvets.2015.00059.
- [145] P. R. J. Fortuna, H. Bielefeldt-Ohmann, D. A. Ovchinnikov, E. J. Wolvetang, et D. J. Whitworth, « Cortical Neurons Derived from Equine Induced Pluripotent Stem Cells Are Susceptible to Neurotropic Flavivirus Infection and Replication: An In Vitro Model for Equine Neuropathic Diseases », *Stem Cells and Development*, vol. 27, n° 10, p. 704-715, mai 2018, doi: 10.1089/scd.2017.0106.
- [146] S. Kausar *et al.*, « A review: Mechanism of action of antiviral drugs », *Int J Immunopathol Pharmacol*, vol. 35, p. 205873842110026, janv. 2021, doi: 10.1177/20587384211002621.
- [147] E. De Clercq et G. Li, « Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years », *Clin Microbiol Rev*, vol. 29, n° 3, p. 695-747, juill. 2016, doi: 10.1128/CMR.00102-15.
- [148] Y. Debing, J. Neyts, et L. Delang, « The future of antivirals: broad-spectrum inhibitors », *Curr Opin Infect Dis*, vol. 28, n° 6, p. 596-602, déc. 2015, doi: 10.1097/QCO.0000000000000212.
- [149] T. T. Ashburn et K. B. Thor, « Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 3, n° 8, p. 673-683, août 2004, doi: 10.1038/nrd1468.
- [150] C. Thieulent *et al.*, « Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: Efficacy of decitabine and valganciclovir alone or in combination », *Antiviral Research*, vol. 183, p. 104931, nov. 2020, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104931.
- [151] E. De Clercq et R. T. Walker, « Chemotherapeutic agents for herpesvirus infections », *Prog Med Chem*, vol. 23, p. 187-218, 1986, doi: 10.1016/s0079-6468(08)70343-6.
- [152] L. Eyer, R. Nencka, E. de Clercq, K. Seley-Radtke, et D. Růžek, « Nucleoside analogs as a rich source of antiviral agents active against arthropod-borne flaviviruses », *Antivir Chem Chemother*, vol. 26, p. 204020661876129, janv. 2018, doi: 10.1177/2040206618761299.
- [153] A. Sinigaglia, E. Peta, S. Riccetti, et L. Barzon, « New avenues for therapeutic discovery against West Nile virus », *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 15, n° 3, p. 333-348, mars 2020, doi: 10.1080/17460441.2020.1714586.
- [154] I. Jordan, T. Briesse, N. Fischer, J. Y. Lau, et W. I. Lipkin, « Ribavirin Inhibits West Nile Virus Replication and Cytopathic Effect in Neural Cells », *J INFECT DIS*, vol. 182, n° 4, p. 1214-1217, oct. 2000, doi: 10.1086/315847.
- [155] S. Benzaria *et al.*, « 2'-C-Methyl Branched Pyrimidine Ribonucleoside Analogues: Potent Inhibitors of RNA Virus Replication », *Antivir Chem Chemother*, vol. 18, n° 4, p. 225-242, août 2007, doi: 10.1177/095632020701800406.
- [156] C. S. de Freitas *et al.*, « Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo », *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 13, n° 1, p. e0007072, janv. 2019, doi: 10.1371/journal.pntd.0007072.
- [157] E. Konkolova *et al.*, « Remdesivir triphosphate can efficiently inhibit the RNA-dependent RNA polymerase from various flaviviruses », *Antiviral Research*, vol. 182, p. 104899, oct. 2020, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104899.
- [158] Y. Furuta, B. B. Gowen, K. Takahashi, K. Shiraki, D. F. Smee, et D. L. Barnard, « Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor », *Antiviral Research*, vol. 100, n° 2, p. 446-454, nov. 2013, doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.
- [159] F. Mentré *et al.*, « Dose regimen of favipiravir for Ebola virus disease », *Lancet Infect Dis*, vol. 15, n° 2, p. 150-151, févr. 2015, doi: 10.1016/S1473-3099(14)71047-3.

- [160] K. Lanko *et al.*, « Replication of the Zika virus in different iPSC-derived neuronal cells and implications to assess efficacy of antivirals », *Antiviral Research*, vol. 145, p. 82-86, sept. 2017, doi: 10.1016/j.antiviral.2017.07.010.
- [161] J.-A. Kim, R.-K. Seong, M. Kumar, et O. Shin, « Favipiravir and Ribavirin Inhibit Replication of Asian and African Strains of Zika Virus in Different Cell Models », *Viruses*, vol. 10, n° 2, p. 72, févr. 2018, doi: 10.3390/v10020072.
- [162] H. Shin, C. Kim, et S. Cho, « Gemcitabine and Nucleos(t)ide Synthesis Inhibitors Are Broad-Spectrum Antiviral Drugs that Activate Innate Immunity », *Viruses*, vol. 10, n° 4, p. 211, avr. 2018, doi: 10.3390/v10040211.
- [163] S. Kuivanen *et al.*, « Obatoclox, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism », *Antiviral Res*, vol. 139, p. 117-128, mars 2017, doi: 10.1016/j.antiviral.2016.12.022.
- [164] C. L. Clouser *et al.*, « Activity of a Novel Combined Antiretroviral Therapy of Gemcitabine and Decitabine in a Mouse Model for HIV-1 », *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 56, n° 4, p. 1942-1948, avr. 2012, doi: 10.1128/AAC.06161-11.
- [165] R. Grunewald, H. Kantarjian, M. Du, K. Faucher, P. Tarassoff, et W. Plunkett, « Gemcitabine in leukemia: a phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study », *J Clin Oncol*, vol. 10, n° 3, p. 406-413, mars 1992, doi: 10.1200/JCO.1992.10.3.406.
- [166] R. K. F. Beran *et al.*, « Cellular growth kinetics distinguish a cyclophilin inhibitor from an HSP90 inhibitor as a selective inhibitor of hepatitis C virus », *PLoS One*, vol. 7, n° 2, p. e30286, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0030286.
- [167] K. Lee, D.-E. Kim, K.-S. Jang, S.-J. Kim, S. Cho, et C. Kim, « Gemcitabine, a broad-spectrum antiviral drug, suppresses enterovirus infections through innate immunity induced by the inhibition of pyrimidine biosynthesis and nucleotide depletion », *Oncotarget*, vol. 8, n° 70, p. 115315-115325, déc. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.23258.
- [168] K. M. Wagstaff, H. Sivakumaran, S. M. Heaton, D. Harrich, et D. A. Jans, « Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus », *Biochem J*, vol. 443, n° 3, p. 851-856, mai 2012, doi: 10.1042/BJ20120150.
- [169] J.-P. Changeux, « The nicotinic acetylcholine receptor: a typical "allosteric machine" », *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 373, n° 1749, p. 20170174, juin 2018, doi: 10.1098/rstb.2017.0174.
- [170] S. A. Shiryayev *et al.*, « Cleavage targets and the D -arginine-based inhibitors of the West Nile virus NS3 processing proteinase », *Biochemical Journal*, vol. 393, n° 2, p. 503-511, janv. 2006, doi: 10.1042/BJ20051374.
- [171] D. Bojkova *et al.*, « Aprotinin Inhibits SARS-CoV-2 Replication », *Cells*, vol. 9, n° 11, p. 2377, oct. 2020, doi: 10.3390/cells9112377.
- [172] Z. Li *et al.*, « Erythrosin B is a potent and broad-spectrum orthosteric inhibitor of the flavivirus NS2B-NS3 protease », *Antiviral Research*, vol. 150, p. 217-225, févr. 2018, doi: 10.1016/j.antiviral.2017.12.018.
- [173] G. Zou *et al.*, « A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor », *Virology*, vol. 384, n° 1, p. 242-252, févr. 2009, doi: 10.1016/j.virol.2008.11.003.
- [174] « Prix Nobel de Médecine 2015 - William C. Campbell and Satoshi Ōmura ». [En ligne]. Disponible sur: www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/press-release
- [175] A. Crump et S. Omura, « Ivermectin, "Wonder drug" from Japan: the human use perspective », *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, vol. 87, n° 2, p. 13-28, 2011, doi: 10.2183/pjab.87.13.
- [176] B. S. Kumar, M. Jeyaraman, R. Jain, et T. C. Anudeep, « A Wonder Drug in the Arsenal against COVID - 19: Medication Evidence from Ivermectin », *JAMMR*, p. 30-37, juill. 2020, doi: 10.9734/jammr/2020/v32i1030512.
- [177] S. Salinas *et al.*, « Deleterious effect of Usutu virus on human neural cells », *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 11, n° 9, p. e0005913, sept. 2017, doi: 10.1371/journal.pntd.0005913.

- [178] J. Haviernik *et al.*, « Arbidol (Umifenovir): A Broad-Spectrum Antiviral Drug That Inhibits Medically Important Arthropod-Borne Flaviviruses », *Viruses*, vol. 10, n° 4, p. 184, avr. 2018, doi: 10.3390/v10040184.
- [179] V. Boldescu, M. A. M. Behnam, N. Vasilakis, et C. D. Klein, « Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 16, n° 8, p. 565-586, août 2017, doi: 10.1038/nrd.2017.33.
- [180] K. K. W. To *et al.*, « Mycophenolic acid, an immunomodulator, has potent and broad-spectrum in vitro antiviral activity against pandemic, seasonal and avian influenza viruses affecting humans », *J Gen Virol*, vol. 97, n° 8, p. 1807-1817, août 2016, doi: 10.1099/jgv.0.000512.
- [181] J. D. Morrey, D. F. Smee, R. W. Sidwell, et C. Tseng, « Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus », *Antiviral Res*, vol. 55, n° 1, p. 107-116, juill. 2002, doi: 10.1016/s0166-3542(02)00013-x.
- [182] M. Qing *et al.*, « Characterization of Dengue Virus Resistance to Brequinar in Cell Culture », *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 54, n° 9, p. 3686-3695, sept. 2010, doi: 10.1128/AAC.00561-10.
- [183] M. Lucas-Hourani *et al.*, « Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity », *PLoS Pathog*, vol. 9, n° 10, p. e1003678, 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003678.
- [184] P. Leyssen, J. Balzarini, E. De Clercq, et J. Neyts, « The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase », *J Virol*, vol. 79, n° 3, p. 1943-1947, févr. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.3.1943-1947.2005.
- [185] L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, et C. Dumontet, « Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 12, n° 6, p. 447-464, juin 2013, doi: 10.1038/nrd4010.
- [186] R. S. Schwab, A. C. England Jr., D. C. Poskanzer, et R. R. Young, « Amantadine in the Treatment of Parkinson's Disease », *JAMA*, vol. 208, n° 7, p. 1168-1170, mai 1969, doi: 10.1001/jama.1969.03160070046011.
- [187] A. B. Blázquez, M. A. Martín-Acebes, et J.-C. Saiz, « Inhibition of West Nile Virus Multiplication in Cell Culture by Anti-Parkinsonian Drugs », *Front Microbiol*, vol. 7, p. 296, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00296.
- [188] W. C. Koff, J. L. Elm, et S. B. Halstead, « Inhibition of dengue virus replication by amantadine hydrochloride », *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 18, n° 1, p. 125-129, juill. 1980, doi: 10.1128/AAC.18.1.125.
- [189] A. I. Chiramel *et al.*, « Alisporivir Has Limited Antiviral Effects Against Ebola Virus Strains Makona and Mayinga », *J Infect Dis*, vol. 214, n° suppl 3, p. S355-S359, oct. 2016, doi: 10.1093/infdis/jiw241.
- [190] N. J. Barrows *et al.*, « A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection », *Cell Host Microbe*, vol. 20, n° 2, p. 259-270, août 2016, doi: 10.1016/j.chom.2016.07.004.
- [191] Q. Nevers *et al.*, « Characterization of the Anti-Hepatitis C Virus Activity of New Nonpeptidic Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors with the Potential for Broad Anti-Flaviviridae Activity », *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 62, n° 7, p. e00126-18, juill. 2018, doi: 10.1128/AAC.00126-18.
- [192] A. Ahmed-Belkacem *et al.*, « Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities », *Nat Commun*, vol. 7, p. 12777, sept. 2016, doi: 10.1038/ncomms12777.
- [193] M. A. Martín-Acebes *et al.*, « Host sphingomyelin increases West Nile virus infection in vivo », *J. Lipid Res.*, vol. 57, n° 3, p. 422-432, mars 2016, doi: 10.1194/jlr.M064212.
- [194] R. Soto-Acosta, P. Bautista-Carbajal, M. Cervantes-Salazar, A. H. Angel-Ambrocio, et R. M. del Angel, « DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target », *PLoS Pathog*, vol. 13, n° 4, p. e1006257, avr. 2017, doi: 10.1371/journal.ppat.1006257.

- [195] X. Qian et Z. Qi, « Mosquito-Borne Flaviviruses and Current Therapeutic Advances », *Viruses*, vol. 14, n° 6, p. 1226, juin 2022, doi: 10.3390/v14061226.
- [196] T. Merino-Ramos, N. Jiménez de Oya, J.-C. Saiz, et M. A. Martín-Acebes, « Antiviral Activity of Nordihydroguaiaretic Acid and Its Derivative Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic Acid against West Nile Virus and Zika Virus », *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 61, n° 8, p. e00376-17, août 2017, doi: 10.1128/AAC.00376-17.
- [197] B. Sainz *et al.*, « Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor », *Nat Med*, vol. 18, n° 2, p. 281-285, janv. 2012, doi: 10.1038/nm.2581.
- [198] J. Lucifora, K. Esser, et U. Protzer, « Ezetimibe blocks hepatitis B virus infection after virus uptake into hepatocytes », *Antiviral Res*, vol. 97, n° 2, p. 195-197, févr. 2013, doi: 10.1016/j.antiviral.2012.12.008.
- [199] J. F. Osuna-Ramos, J. M. Reyes-Ruiz, et R. M. del Ángel, « The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection », *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 8, p. 388, nov. 2018, doi: 10.3389/fcimb.2018.00388.
- [200] M. A. Martín-Acebes, N. Jiménez de Oya, et J.-C. Saiz, « Lipid Metabolism as a Source of Druggable Targets for Antiviral Discovery against Zika and Other Flaviviruses », *Pharmaceuticals*, vol. 12, n° 2, p. 97, juin 2019, doi: 10.3390/ph12020097.
- [201] A. O. Sodero et F. J. Barrantes, « Pleiotropic effects of statins on brain cells », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1862, n° 9, p. 183340, sept. 2020, doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183340.
- [202] E. Hennessy, C. Adams, F. J. Reen, et F. O’Gara, « Is There Potential for Repurposing Statins as Novel Antimicrobials? », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, n° 9, p. 5111-5121, sept. 2016, doi: 10.1128/AAC.00192-16.
- [203] A. Fracassi *et al.*, « Statins and the Brain: More than Lipid Lowering Agents? », *CN*, vol. 17, n° 1, p. 59-83, déc. 2018, doi: 10.2174/1570159X15666170703101816.
- [204] C. Rothwell *et al.*, « Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication », *Virology*, vol. 389, n° 1-2, p. 8-19, juin 2009, doi: 10.1016/j.virol.2009.03.025.
- [205] M. Martinez-Gutierrez, L. A. Correa-Londoño, J. E. Castellanos, J. C. Gallego-Gómez, et J. E. Osorio, « Lovastatin delays infection and increases survival rates in AG129 mice infected with dengue virus serotype 2 », *PLoS One*, vol. 9, n° 2, p. e87412, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0087412.
- [206] R. Soto-Acosta *et al.*, « The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity », *Virology*, vol. 442, n° 2, p. 132-147, août 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.04.003.
- [207] O. L. Bryan-Marrugo *et al.*, « The anti-dengue virus properties of statins may be associated with alterations in the cellular antiviral profile expression », *Mol Med Rep*, vol. 14, n° 3, p. 2155-2163, sept. 2016, doi: 10.3892/mmr.2016.5519.
- [208] J. Ye, C. Wang, R. Sumpter, M. S. Brown, J. L. Goldstein, et M. Gale, « Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, n° 26, p. 15865-15870, déc. 2003, doi: 10.1073/pnas.2237238100.
- [209] G. del Real *et al.*, « Statins Inhibit HIV-1 Infection by Down-regulating Rho Activity », *Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, n° 4, p. 541-547, août 2004, doi: 10.1084/jem.20040061.
- [210] F. Mohd Jaafar, B. Monsion, M. Belhouchet, P. P. C. Mertens, et H. Attoui, « Inhibition of Orbivirus Replication by Fluvastatin and Identification of the Key Elements of the Mevalonate Pathway Involved », *Viruses*, vol. 13, n° 8, p. 1437, juill. 2021, doi: 10.3390/v13081437390/.
- [211] D. Brnic *et al.*, « Borna disease virus infects human neural progenitor cells and impairs neurogenesis », *J Virol*, vol. 86, n° 5, p. 2512-2522, mars 2012, doi: 10.1128/JVI.05663-11.
- [212] C. Scordel *et al.*, « Borna disease virus phosphoprotein impairs the developmental program controlling neurogenesis and reduces human GABAergic neurogenesis », *PLoS Pathog*, vol. 11, n° 4, p. e1004859, avr. 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004859.

- [213] L. J. Reed et H. Muench, « A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS », *THE AMERICAN JOURNAL OF HYGIENE*, vol. 27, n° 3, mai 1938.
- [214] C. Ritz, F. Baty, J. C. Streibig, et D. Gerhard, « Dose-Response Analysis Using R », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 12, p. e0146021, déc. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0146021.
- [215] M. A. Brinton, « The Molecular Biology of West Nile Virus: A New Invader of the Western Hemisphere », *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 56, n° 1, p. 371-402, oct. 2002, doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160654.
- [216] M. Martínez-Gutierrez, J. E. Castellanos, et J. C. Gallego-Gómez, « Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly », *Intervirology*, vol. 54, n° 4, p. 202-216, 2011, doi: 10.1159/000321892.
- [217] A. M. Gorabi *et al.*, « Antiviral effects of statins », *Progress in Lipid Research*, vol. 79, p. 101054, juill. 2020, doi: 10.1016/j.plipres.2020.101054.
- [218] M. A. Lancaster *et al.*, « Cerebral organoids model human brain development and microcephaly », *Nature*, vol. 501, n° 7467, p. 373-379, sept. 2013, doi: 10.1038/nature12517.
- [219] M. Blanchet, Q.-T. Le, N. G. Seidah, et P. Labonté, « Statins can exert dual, concentration dependent effects on HCV entry in vitro », *Antiviral Research*, vol. 128, p. 43-48, avr. 2016, doi: 10.1016/j.antiviral.2016.02.006.
- [220] Q. Pan, A. J. van Vuuren, L. J. W. van der Laan, M. P. Peppelenbosch, et H. L. A. Janssen, « Antiviral or proviral action of mycophenolic acid in hepatitis B infection? », *Hepatology*, vol. 56, n° 4, p. 1586-1587, oct. 2012, doi: 10.1002/hep.25700.
- [221] K. Hoppe-Seyler, P. Sauer, C. Lohrey, et F. Hoppe-Seyler, « The inhibitors of nucleotide biosynthesis leflunomide, FK778, and mycophenolic acid activate hepatitis B virus replication in vitro », *Hepatology*, vol. 56, n° 1, p. 9-16, juill. 2012, doi: 10.1002/hep.25602.
- [222] A. A. Martinez *et al.*, « Breathing new life into West Nile virus therapeutics; discovery and study of zafirlukast as an NS2B-NS3 protease inhibitor », *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 157, p. 1202-1213, sept. 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.08.077.
- [223] J. Beloor *et al.*, « Small Interfering RNA-Mediated Control of Virus Replication in the CNS Is Therapeutic and Enables Natural Immunity to West Nile Virus », *Cell Host & Microbe*, vol. 23, n° 4, p. 549-556.e3, avr. 2018, doi: 10.1016/j.chom.2018.03.001.