



HAL
open science

Impact de Coxsackievirus B4 sur les cellules

Antoine Bertin

► **To cite this version:**

Antoine Bertin. Impact de Coxsackievirus B4 sur les cellules. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS064 . tel-03528290

HAL Id: tel-03528290

<https://theses.hal.science/tel-03528290>

Submitted on 17 Jan 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie Santé

Pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : **Virologie**

Impact de Coxsackievirus B4 sur les cellules

Présentée et soutenue par :
Antoine BERTIN

Le 16 octobre 2019

Devant le jury composé de :

Pr. Gilles DUVERLIE
Dr. Maël BESSAUD
Pr. Djamel DRIDER
Pr. Didier HOBER



REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de nombreuses personnes qu'il me faut remercier.

Je remercie le **Pr Didier HOBBER**. Tout d'abord pour avoir été mon directeur de thèse, mais aussi pour m'avoir soutenu et encadré bien avant mon entrée en doctorat. Pour les enseignements qu'il m'a prodigués, tant au niveau théorique, que la rigueur et l'attention au détail qu'il m'a inculqués. Pour sa disponibilité et le temps qu'il m'a accordé. Enfin, pour la place importante qu'il a laissée aux discussions au cours de ma thèse, dans l'élaboration de ce travail, Merci.

Je remercie le **Pr Gilles DUVERLIE**, et le **Pr Djamel DRIDER**, pour avoir accepté de suivre mon travail au cours de mon doctorat, et de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie également le **Dr Maël BESSAUD** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Ce travail a pu être effectué grâce à nos collaborateurs que je remercie : l'équipe de l'U1190, **Valery GMYR**, le **Pr François PATTOU**, le **Pr Julie KERR-CONTE**, l'équipe du laboratoire PRISM et la plateforme Clic-imaging, **Jean-Pascal GIMENO**, le **Pr Isabelle FOURNIER** et le **Pr Michel SALZET**, l'équipe de Geneuro, le **Pr Hervé PERRON**, **Sandrine LEVET**, **Benjamin CHARVET** et **Justine PIERQUIN**.

Je tiens tout particulièrement à remercier toute l'équipe du laboratoire de virologie EA3610, dont l'aide quotidienne m'a permis d'accomplir ce travail. Famara pour sa philosophie et son aide avisée, et pour être toujours là lorsqu'on a besoin de lui ! Kazali pour son éternelle bonne humeur et ses précieux conseils. Arthur et Axel pour avoir eu la patience de partager mon bureau. Cédric pour sa disponibilité et son écoute. Delphine pour sa part dans ce travail, et toutes les autres personnes ayant participé de près ou de loin à mon doctorat, Ilka, Pierre-Emmanuel, Pr Romond, Angelo...

Je remercie mes parents, pour avoir toujours fait de l'éducation de leurs enfants une priorité.

Enfin, je remercie ma famille et mes proches pour m'avoir soutenu pendant ces trois années, bien avant pour certains, certainement encore après pour d'autres !

Sommaire

Résumé.....	1
Abstract	3
Liste des abréviations	5
Introduction.....	7
Coxsackievirus B4	7
Taxonomie et Structure.....	7
Cycle de réplication	9
Infection persistante	12
Diabète de type 1	13
L'insuline.....	13
Pathogénèse du diabète de type 1.....	16
Objectifs	22
Matériel et Méthodes	23
Lignées cellulaires.....	23
Cellules pancréatiques humaines.....	23
Macrophages dérivés de CMN humaines.....	24
Virus.....	24
Détermination du titre viral	24
Infection des cellules.....	25
Test de viabilité à l'uptiblue et au bleu trypan.....	25
Extraction d'ADN et d'ARN.....	25
RT-PCR suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose	26
RT-PCR Quantitative	26
Quantification de l'insuline, de la proinsuline et du c-peptide	27
Immunofluorescence.....	27
Quantification de la méthylation de l'ADN	28
Extraction de protéines	29
Quantification de la protéine HERV-W Env	29
Digestion des protéines pour traitement en spectrométrie de masse	29
Spectrométrie de masse LC-MS/MS.....	30
Résultats.....	31
Partie I : Infection persistante à CV-B4 de cellules canalaire pancréatiques humaines primaires..	31
I/ Les cellules canalaire pancréatiques humaines primaires peuvent être différenciées en ICA sécréteurs d'insuline	31
II/ CV-B4 E2 peut persister dans des cellules canalaire humaines primaires <i>in vitro</i>	31

III/ L'infection persistante à CV-B4 E2 peut inhiber la production d'insuline par des cellules canalaire s pancréatiques humaines primaires différenciées.....	35
Synthèse	36
Partie II : Infection persistante à CV-B4 de cellules β et conséquences.....	37
I/ CV-B4 E2 infecte de manière persistante des cellules β pancréatiques.....	37
II/ L'infection persistante à CV-B4 E2 de cellules β pancréatiques provoque des modifications du mé ta bolisme de l'insuline	40
III/ L'infection persistante à CV-B4 E2 de cellules β pancréatiques modifie l'expression de protéines cellulaires pancréatiques	41
IV L'infection persistante à CV-B4 E2 de cellules β pancréatiques provoque des modifications de mé th ylation de l'ADN.	44
Synthèse	45
Partie III : Expression de HERV-W Env dans des cellules infectées par CV-B4	46
I/ Expression du gène HERV-W Env dans des cultures de macrophages humains primaires infectées par CV-B4	46
II/ Expression du gène HERV-W Env dans des cultures de cellules pancréatiques humaines primaires infectées par CV-B4	49
DISCUSSION	53
Partie I : Infection persistante à CV-B4 de cellules canalaire s pancréatiques humaines primaires..	53
Partie II : Infection persistante à CV-B4 de cellules β et conséquences.....	55
Partie III : Expression de HERV-W Env dans des cellules infectées par CV-B4	59
Conclusion	62
Liste des publications	63
Bibliographie.....	64

Résumé

Coxsackievirus B4 (CV-B4) est un virus du genre *Enterovirus* et de la famille des *Picornaviridae*. Il s'agit d'un virus à réplication cytoplasmique. C'est un virus qui provoque un effet cytopathique apparaissant rapidement dans les cellules in vitro. Des travaux antérieurs de notre équipe ont démontré que CV-B4 E2 était capable de persister dans certaines lignées cellulaires pancréatiques et d'induire des modifications d'expression du gène PDX1. La persistance de CV-B4 E2 dans les cellules et ses conséquences peuvent jouer un rôle dans la pathogénèse du diabète de type 1 (DT1).

Les objectifs de ce travail sont : i) d'étudier la persistance de CV-B4 E2 dans des modèles de cellules pancréatiques, et les conséquences de l'infection dans ces cellules et notamment en ce qui concerne la sécrétion d'insuline ii) d'étudier l'impact de l'infection à CV-B4 E2 sur l'expression d'une protéine de rétrovirus endogène, impliquée dans la pathogénèse du diabète de type 1, dans des macrophages et des cellules pancréatiques primaires humaines in vitro.

Des cellules canalaire pancréatiques issues de donneurs en état de mort cérébrale ont été cultivées pendant 7 semaines. La différenciation en cellules productrices d'insuline formant des agrégats ressemblant à des îlots a été induite. Dans les cellules canalaire, CV-B4 E2 provoquait la mort des cellules en 48 heures dans 5 cultures sur 7. Dans les 2 autres, le virus a persisté pendant 29 jours sans provoquer la mort des cellules. Dans ces cellules la formation d'agrégats ressemblant à des îlots était inhibée ainsi que la sécrétion d'insuline.

Des cellules β de rat (lignée INS1) ont été infectées par CV-B4 E2. Après une crise aiguë la culture s'est poursuivie sans effet cytopathique visible au microscope inversé. La quantité d'insuline présente dans le surnageant de culture n'était pas modifiée par l'infection. Par contre, une quantité plus importante de proinsuline a été retrouvée dans les surnageants des cultures infectées. La pro-hormone convertase 2 (PC2) est une enzyme impliquée dans la maturation de la proinsuline en insuline. L'expression de l'ARNm de cette protéine, étudiée par RT-PCR en temps réel, était inhibée dans les cultures infectées. Il a été observé que l'ADN des cellules infectées de manière persistante était hyperméthylé comparé aux contrôles. Le profil protéique des cellules β analysé par spectrométrie de masse SHOTGUN était modifié. Nos travaux montrent que l'infection à CV-B4E2 persistante a un impact sur les cellules β et notamment sur le métabolisme de l'insuline.

Il a été rapporté une augmentation d'expression du gène HERV-W Env chez les patients avec un DT1. L'expression de ce gène a été recherchée dans des cultures de macrophages et de cellules pancréatiques canalaire primaires humains, infectées par CV-B4 E2. Des cellules mononucléées du

sang périphérique de 14 donneurs, ont été cultivées en présence de M-CSF afin de les différencier en macrophages. Dans les cultures de macrophages de 6 d'entre eux, l'infection par CV-B4 a provoqué une expression accrue de l'ARNm d'HERV-W Env, mise en évidence par RT-PCR en temps réel. Des cellules canalaire obtenues à partir du pancréas de 5 individus en état de mort-cérébrale ont été infectées par CV-B4. Une expression accrue de l'ARNm d'HERV-W Env a été retrouvée dans les cultures de cellules canalaire pancréatique de 4 d'entre eux. La protéine HERV-W Env a également été retrouvée en quantité plus abondante dans les cellules canalaire infectées que dans les cellules contrôles. Ces travaux montrent que l'infection par CV-B4 E2 de cellules canalaire pancréatique et de macrophages active la transcription du rétrovirus endogène HERV-W.

En conclusion, qu'elle soit aiguë ou persistante, l'infection à CV-B4 a un impact sur les cellules. Les modifications cellulaires provoquées par le virus peuvent jouer un rôle dans le développement de la pathogénèse du diabète de type 1.

Abstract

Coxsackievirus B4 (CV-B4) is a virus from the genus *Enterovirus* and the family *Picornaviridae*. It replicates in the cytoplasm of infected cells, and causes a cytopathic effect that appears rapidly *in vitro*. Previous work from our team demonstrated that CV-B4 E2 could persist in pancreatic cell lines and inhibit the expression of PDX1 gene. The persistence of CV-B4 E2 in these cells, and its consequences can be involved in the pathogenesis of Type 1 Diabetes (T1D).

The aims of this work were : i) to study the persistence of CV-B4 E2 in pancreatic cells, and the consequences of this infection in these cells, particularly regarding insulin ii) to evaluate the impact of CV-B4 E2 infection on the expression of an endogenous retrovirus potentially involved in T1D, in macrophages, and human primary pancreatic cells *in vitro*.

Pancreatic ductal cells from brain dead donors have been cultured for 7 weeks. The differentiation of these cells into insulin producing cell aggregates that resemble islet cells has been induced. In ductal cells, CV-B4 E2 caused cell death in 48H in 5 cultures out of 7. In the other 2 cultures, the virus persisted up to 29 days without inducing cell death. In these cells, the formation of islet-like aggregates was inhibited, as well as insulin secretion.

β -cells (INS1 cell line) were infected with CV-B4 E2. After an acute crisis, the culture continued without any cytopathic effect noticeable under an inverted microscope. The quantity of insulin in the supernatant of the culture was not modified by the infection. Yet, a higher quantity of proinsulin was detected in the supernatants of infected cultures. Pro-hormone convertase 2 (PC2) is an enzyme involved in the processing of proinsulin into insulin. The mRNA level of this protein, analyzed with real-time RT-PCR, was inhibited in infected cultures. It was observed that DNA of persistently infected cells was hypermethylated compared to controls. The profile of proteins expressed by β cell analyzed by SHOTGUN mass spectrometry was modified. Our work shows that persistent CV-B4 E2 infection has an impact on β cells, especially on insulin metabolism.

An increase in the expression of HERV-W Env gene has been reported in patients with T1D. The expression of this gene has been investigated in primary human macrophages and pancreatic ductal cells, infected with CV-B4 E2. Peripheral blood mononuclear cells have been extracted from 14 donors, and cultured with M-CSF to differentiate them into macrophages. In 6 macrophage cultures, CV-B4 infection caused a raise in HERV-W Env mRNA level, as shown by real time RT-PCR. Pancreatic ductal cells, obtained from 5 brain dead donors, have been infected with CV-B4. An increased expression of HERV-W Env mRNA has been found in 4 pancreatic ductal cultures. The protein HERV-W Env has also been found in greater quantities in infected cells than in control cells. This work

indicates that CV-B4 E2 infection of pancreatic ductal cells and macrophages activates the transcription of HERV-W Env.

In conclusion, CV-B4 infection, whether it is acute or persistent, has an impact on pancreatic cells. The cellular modification brought by the virus can play a role in T1D pathogenesis.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARN_{db} : ARN double-brin
ARNm : ARN messenger
BMP : Bone morphogénétic protein
CAR : Coxsackie and Adénovirus Receptor
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMN : Cellules mononucléées
CsA : Cyclosporine A
CV-B : Coxsackievirus-B
DAF : Decay Accelerating Factor
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DT1 : Diabète de type 1
EBV : Virus d'Epstein-Barr
ECP : Effet cytopathique
EIF : Eukaryotic translation initiation factor
ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent assay
EV : Entérovirus
FDR : False Discovery rate
HERV : Human Endogenous Retrovirus
HHV : Human Herpesvirus 6
HNRNP : Heterogenous ribonucleoprotein particle
GAD : Glutamate decarboxylase
ICA : Islet-like cell aggregates
IF : Immunofluorescence
IFI : Immunofluorescence indirecte
IFN : Interféron
IGF : Insulin-like growth factor
IL : Interleukin
IRES : Internal ribosome entry site
LC : Liquid Chromatography
M-CSF : Monocyte colony-stimulating factor

MEM : Minimum essentiel medium
MOI : Multiplicity of infection
MS : Mass Spectrometry
ORF : Open reading frame
PBS : Phosphate buffer saline
PC1 : Pro-hormone convertase 1
PC2 : Pro-hormone convertase 2
PCR : Polymerase chain reaction
PDX1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1
PKR : Protein kinase R
RIPA : Radioimmunoprecipitation assay buffer
RT-PCR : Retro-transcription pcr
RT-qPCR : Retro-transcription quantitative pcr
SEP : Sclérose en plaques
SFM : Serum-free medium
SVF : Sérum de veau fœtal
TNF : Tumor necrosis factor
UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography
UTR : Untranslated region
VP : Viral protein

Introduction

Coxsackievirus B4

Taxonomie et Structure

Chaque année, le nombre d'infections à entérovirus chez l'Homme est estimé à près d'un milliard. (Palacios and Oberte, 2005). Dans la plupart des cas, les conséquences de telles infections sont limitées à des syndromes viraux non spécifiques ; fièvre, céphalées, myalgies. Cependant, les entérovirus sont également la cause de pathologies sévères, telles que des encéphalites et myocardite, ou encore la poliomyélite provoquée par le poliovirus (Delpeyroux et al., 2013).

Dans la famille des *Picornaviridae* le genre Enterovirus comporte plusieurs espèces (**Tableau 1**). L'espèce Enterovirus B comprend notamment coxsackievirus B4 (CV-B4) et 5 autres sérotypes de coxsackievirus B (CV-B) 1-6 (Nikonov et al., 2017). Les CV-B sont de petits virus (<30nm) non enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. Leur capsid de symétrie cubique dont la forme est icosaédrique, comporte 60 capsomères dont chacun est constitué des 4 protéines structurales du virus ; VP1, VP2, VP3 et VP4. En cristallographie à rayons X, seules les protéines VP1, VP2 et VP3 sont visibles à la surface de la capsid, VP4 est à l'intérieur de la capsid (Mucklebauer and Rossman, 1997). La capsid virale possède 20 faces, et 12 sommets. Les sommets de la capsid sont des structures tridimensionnelles formées d'assemblage de 5 protéines VP1. Chaque sommet est entouré d'une dépression appelée « canyon », constituée principalement des protéines VP2 et VP3, abritant une poche hydrophobe constituée de la protéine VP1, qui est l'un des principaux sites d'interaction de la capsid avec ses récepteurs cellulaires spécifiques (Mucklebauer and Rossman, 1997).

A l'intérieur de la capsid se trouve la protéine VPg, liée à l'ARN génomique du virus. Le génome de CV-B4, qui mesure près de 7400 bases, présente 2 régions non traduites (UTR) aux extrémités 5' et 3', une queue poly-A en 3', mais est dénué de coiffe en 5'. Ces séquences hautement conservées contribuent à la stabilité du génome viral (Romero et al., 1997). Entre ces deux UTR se trouve un cadre ouvert de lecture (ORF) unique, codant pour les différentes protéines virales. L'ARN de CV-B4 est divisé en 3 régions P1, P2 et P3. La région P1 code pour les protéines structurales du virus (VP1, VP2, VP3 et VP4) tandis que les régions P2 et P3 codent pour les protéines non structurales du virus qui exercent leur fonction lors du cycle de réplication du virus (**Figure 1**). Lors de l'infection d'une cellule par CV-B4, l'ARN génomique est directement traduit en une seule polyprotéine virale par les ribosomes cellulaires, par le biais de la séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) de l'ARN viral.

Tableau 1 : Classification des entérovirus

Genus	Specie	Number of serotypes Notables viruses
Enterovirus	Enterovirus A	25 serotypes CV-A16 EV-A71
	Enterovirus B	63 serotypes CV-B1 - CV-B6
	Enterovirus C	23 serotypes PV-1
	Enterovirus D	5 serotypes EV-D68
	Enterovirus E	4 serotypes
	Enterovirus F	6 serotypes
	Enterovirus G	16 serotypes
	Enterovirus H	4 serotypes A-2 plaque virus
	Enterovirus J	6 serotypes
	Rhinovirus A	80 serotypes
	Rhinovirus B	32 serotypes
	Rhinovirus C	55 serotypes
	Unclassified	SV-47, EV-122 and EV-123

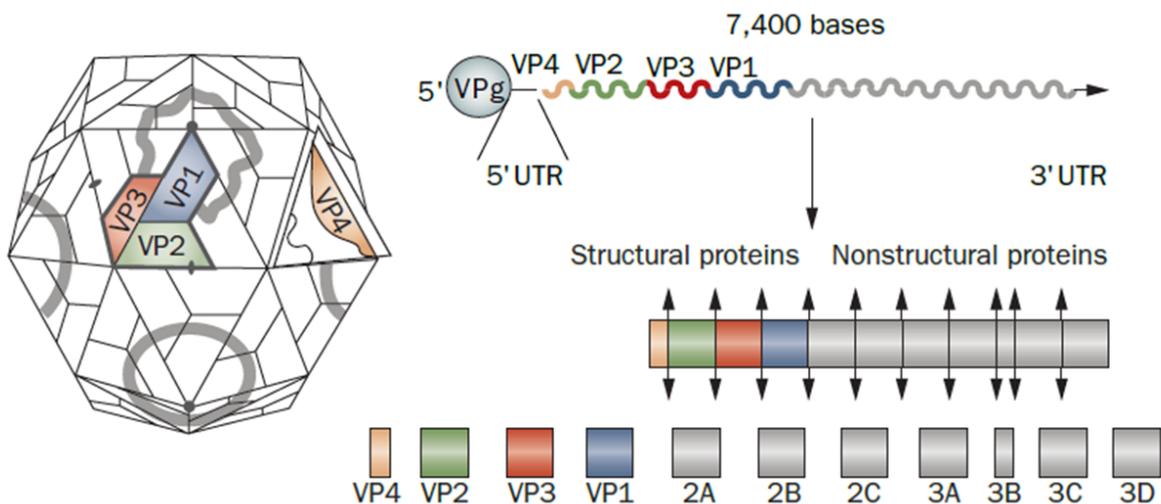


Figure 1 : Structure et génome de CV-B4. La capside icosahédrique de CV-B4 est formée de 60 capsomères, chaque capsomère étant constitué d'un assemblage des protéines VP1-4. La capside abrite l'ARN génomique du virus d'environ 7400 bases. L'ARN de CV-B4 est simple-brin, linéaire et de polarité positive (directement traduit en protéine par les ribosomes), lié de manière covalente à la protéine VPg. Le génome code pour une polyprotéine virale qui, une fois clivée, formera les protéines

Cycle de réplication

CV-B4, comme tous les entérovirus, se transmet essentiellement par voie fécale-orale. L'infection se répand après franchissement de la paroi intestinale (Pister et al., 2001). Lorsque le virus rencontre une cellule permissive, il s'attache à un récepteur cellulaire spécifique. Le récepteur le plus courant des CV-B est CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor), une molécule d'adhésion interagissant notamment avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Loustalot et al., 2016). Un autre récepteur potentiel des CV-B est DAF (Decay Accelerating Factor) ou CD55, un régulateur du système du complément (Clarke and Tenner, 2014). Une fois le virus fixé à son récepteur, le complexe est endocyté, et l'ARN viral est injecté dans le cytoplasme de la cellule hôte. Directement après, l'ARN viral est pris en charge par les ribosomes cellulaires via la séquence IRES, et traduit en une seule polyprotéine. Dès sa traduction, la polyprotéine sera clivée en série jusqu'à ce que les protéines virales matures soient obtenues.

La polyprotéine est clivée par des protéases en *cis* (protéases présentes dans la séquence de la polyprotéine) dans un premier temps, puis par des protéases en *cis* et en *trans* (protéase présente sur une autre molécule que la protéine clivée). Le premier clivage de la polyprotéine s'effectue entre P1 et P2, par la protéase 2A^{pro} en *cis*. Cette protéase est également responsable du clivage de certaines protéines cellulaires, telles que les facteurs d'initiation de la traduction des ARN cellulaires eIF4GI et eIF4GII, favorisant ainsi la traduction des protéines virales au détriment de la traduction des protéines cellulaires (Gradi et al., 1998). L'autre clivage majeur de la polyprotéine virale a lieu entre les régions P2 et P3 de la polyprotéine, et est effectué par la protéase 3C^{pro}. La 3C^{pro} et la protéase 3CD^{pro} effectuent également des clivages secondaires dans les protéines précurseurs P1, P2 et P3. Les clivages effectués sur les précurseurs P1, P2 et P3 permettent l'obtention des protéines virales matures.

Parmi les protéines non structurales se trouve la protéine 3D^{pol}. Il s'agit de l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus. La réplication de l'ARN viral se fait à la surface d'une vésicule cellulaire de 200 à 400nm de diamètre, aux propriétés similaire à celles d'un autophagosome, dont la synthèse est induite par différentes protéines du virus (Ng et al., 2008). De nombreuses protéines interviennent lors du processus de réplication de l'ARN viral. La protéine 2BC reste longtemps sous la forme de précurseur des protéines 2B et 2C, et induit notamment la formation de la vésicule de réplication. La protéine 2B intervient par la formation de pores membranaires, bien que sa fonction précise dans la synthèse d'ARN ne soit pas exactement connue. La protéine 2C possède une activité

NTPase essentielle à la réplication de l'ARN viral. Certains antiviraux, tels que le guanidine hydrochloride ou la fluoxétine, ciblant la protéine 2C entraînent une diminution importante de la synthèse d'ARN viral, attestant de l'importance de 2C dans la réplication de l'ARN viral (Bauer et al., 2019). La 3D^{pol} réplique l'ARN viral en se servant de l'ARN génomique de polarité positive comme matrice pour synthétiser de l'ARN complémentaire de polarité négative, qui est un intermédiaire de réplication au virus. L'ARN négatif servira donc à transcrire davantage d'ARN positif pour la synthèse de protéines.

La traduction massive des protéines virales permet d'avoir suffisamment de protéines structurales pour former les capsides virales. Dans un premier temps, les protéines VP1, VP3 et VP0 (protéine virale immature formée de VP2 et VP4) forment un monomère. Ces monomères constitués de VP1, VP3 et VP0 s'organisent ensuite en pentamères. L'assemblage de 12 pentamères forme la capside du provirion immature, qui deviendra virion mature lors du clivage de VP0 en VP2 et VP4 (Pister et al., 1992). Les pentamères s'associent ensuite à l'ARN viral génomique, au niveau des vésicules cellulaires à la surface desquelles l'ARN est répliqué. La vésicule de réplication empêche l'assemblage du virion, ainsi, la capside ne s'assemble complètement que lorsque l'ARN est entièrement synthétisé (Pister et al., 1992). Les capsides contenant l'ARN génomique du virus sont alors des provirions capables d'infecter de nouvelles cellules une fois libérés de leur cellule hôte (**Figure 2**).

Des mécanismes cellulaires tels que l'apoptose et l'autophagie interagissent avec la réplication du virus. Il a été observé que l'infection par un entérovirus induit l'apoptose des cellules infectées (Desailloud et al., 2009 ; Joo et al., 2002 ; Yuan et al., 2003). Les mécanismes d'induction d'apoptose sont divers. L'infection par un entérovirus active notamment de manière transcriptionnelle et traductionnelle la caspase 3, ainsi que le clivage de la procaspase 3 (Yuan et al., 2003). L'infection par CV-B3 induit la libération de cytochrome c, et le clivage des pro-caspases 2, 3, 6, 7, 8 et 9 (Carthy et al., 2003). L'activation conformationnelle de la protéine pro-apoptotique Bax a également été documentée lors de l'infection à entérovirus (Cong et al., 2016). L'induction de l'apoptose est mise à profit par le virus pour la libération des virions néo-formés. CV-B4 utilise des voies similaires pour favoriser sa libération, en interagissant à la fois avec les voies d'apoptose et de nécrose (Jensen et al., 2013).

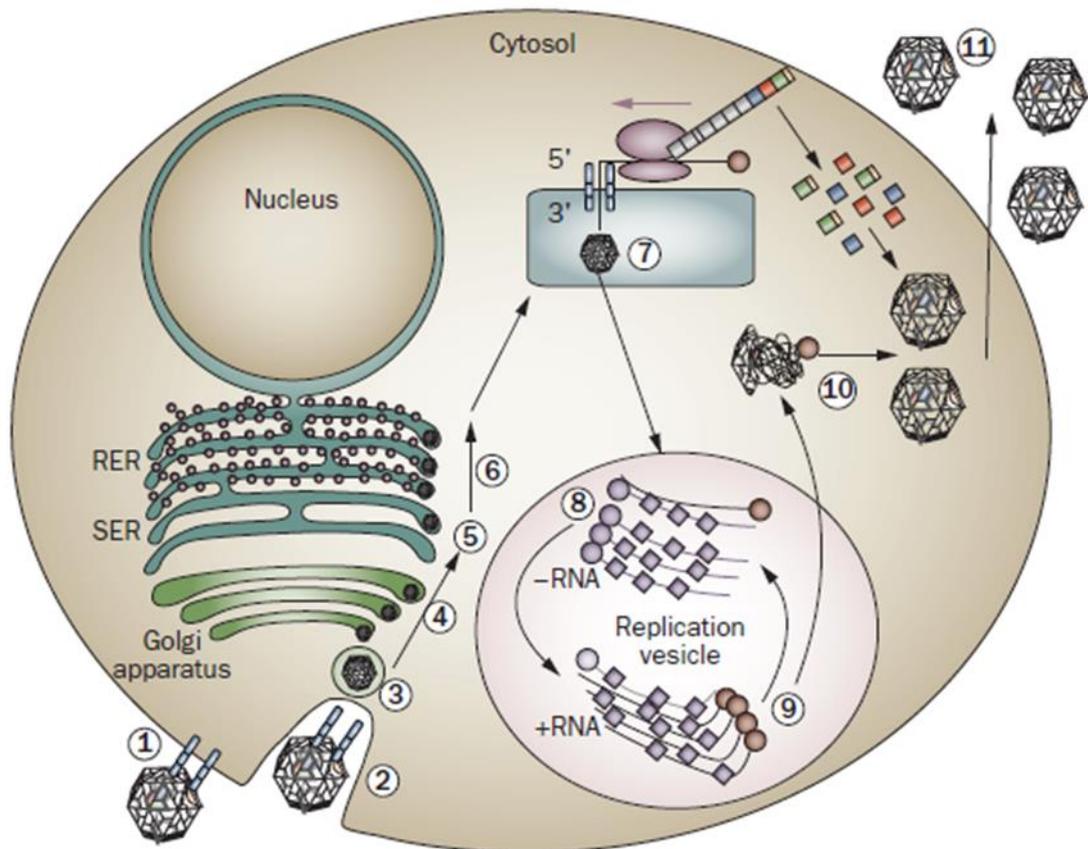


Figure 2 : Cycle de réplication de CV-B4. CV-B4 se réplique à l'intérieur d'une cellule hôte comportant un récepteur spécifique, et en s'attachant à celui-ci (1). Le complexe virus-récepteur est endocyté (2) puis transporté par des vésicules (3) au travers de la cellule, en passant par l'appareil de Golgi (4), le réticulum endoplasmique lisse (5) et rugueux (6). La décapsidation du génome viral, et sa traduction ont lieu à la surface du réticulum endoplasmique rugueux : l'ARN viral est traduit par les ribosomes de la cellule en une seule polyprotéine, qui sera ensuite clivée pour former les différentes protéines virales (7). Le virus induit la formation d'une vésicule de réplication à la surface de laquelle son ARN génomique positif sera traduit en intermédiaire de réplication ARN négatif (8), qui servira à son tour de matrice pour former davantage d'ARN génomique viral (9). L'ARN viral est ensuite encapsidé dans les protéines structurales du virus (10), puis les virions néo-formés sont libérés de la cellule (11). D'après Hober and Sauter 2010

Plusieurs études ont démontré que l'induction de l'autophagie favorisait l'infection par les entérovirus (Lai et al., 2016 ; Lee et al., 2014). L'autophagie intervient lors de différentes étapes du cycle viral. Dès la réplication de l'ARN, le virus détourne cette fonction cellulaire pour permettre la formation de la vésicule de réplication (Salonen et al., 2005). L'autophagie est également mise à profit par le virus pour la libération des virions mature par la formation de vésicules autophagiques

contenant des virus, et sortant de la cellule sans qu'il y ait de lyse cellulaire (Robinson et al., 2014 ; Garmaroudi et al., 2015 ; Bird et al., 2014 ; Mutsafi and Altan-Bonnet, 2018).

La majorité des infections à CV-B sont asymptomatiques, mais des pathologies sévères peuvent également survenir. Des infections cardiaques à CV-B peuvent causer des myocardites ou péricardites. L'atteinte du système nerveux par le virus se traduit par une méningite, voire une encéphalite virale au pronostic réservé (Du Pasquier et al., 2009). Les CV-B sont impliqués dans diverses manifestations cliniques, telles que des polymyosites, certains cas d'hépatites, ou de pancréatites (Crowell et al., 1997). En plus d'un cycle lytique, et des nombreuses infections aiguës dont les CV-B sont la cause, ils provoquent également des infections persistantes.

Infection persistante

La persistance des CV-B fait intervenir des mécanismes propres aux virus, tels que des modifications de l'ARN génomique, mais également des facteurs de l'hôte, notamment le métabolisme des cellules hébergeant le virus (Hober and Sauter 2010, Alidjinou et al., 2014).

De 30 à 40% des cardiomyopathies dilatées sont dues à une infection persistante à CV-B (Huber and Lodge 1984). La persistance du virus est mise en évidence par la détection d'ARN de CV-B dans l'endomyocarde (KOIDE et al. 1992). Une délétion de 17 à 50 nucléotides en 5' de l'ARN viral est observée dans le cas d'infections persistantes associées à une cardiomyopathie dilatée (Bouin et al., 2019). Les délétions terminales en 5' du génome viral entraînent une réduction de l'effet cytopathique du virus en culture cellulaire, et une réplication virale ralentie (Jaramillo et al., 2016). Des CV-B dont l'ARN est délété en 5' sont capables de persister dans des cellules cardiaques, mais également dans des cellules pancréatiques (Chapman et al., 2008, Tracy et al., 2015).

La persistance du virus est également permise lors de l'infection à CV-B de cellules progénitrices de neurones (Rhoades et al., 2011, Feuer et al., 2005). Il est suspecté que le statut de prolifération de ces cellules soit un des éléments permettant la persistance du virus. En effet, le cycle cellulaire joue un rôle primordial dans l'infection des cellules par des CV-B, et la persistance du virus dans les cellules (Feuer et al., 2002). L'ARN viral retrouvé dans ces cellules est essentiellement de l'ARN positif en début d'infection. Néanmoins, le ratio ARN positif et ARN négatif diminue au cours de l'infection pour tendre vers un ratio 1:1 (Feuer et al., 2009). L'équivalence entre l'ARN positif et l'ARN négatif suggère que le virus existe sous une forme d'ARN double brin (ARN_{db}). L'ARN_{db}, qui sert d'intermédiaire de réplication lors de l'infection, est plus stable que l'ARN génomique monocaténaire, permettant au virus de subsister dans la cellule (Tam et al., 1999). De tels mécanismes de persistance sont notamment mis en cause dans l'encéphalite causée par l'infection à CV-B (Feuer et al., 2009).

L'infection à CV-B de cellules pancréatiques induit d'ordinaire une lyse cellulaire massive (Anagandula et al., 2014, Alidjinou et al., 2014). Néanmoins, la détection d'ARN viral dans le pancréas de patients diabétiques suggère que les CV-B sont capables de persister dans les cellules pancréatiques (Ylipaasto et al., 2004). Les mécanismes permettant aux CV-B de persister dans le pancréas sont encore peu connus. Certaines souches de CV-B4 semblent cependant plus enclines à persister dans le pancréas. Des modifications de l'ARN génomique de CV-B4, entraînant des changements au niveau des protéines de surface de virus, ont été décrites (Yin et al., 2002). L'apparition de variants « persistants » de CV-B a pu être étudiée in vitro, et résulterait d'une coévolution entre les cellules infectées et le virus (Alidjinou et al., 2017 ; Pinkert et al., 2011).

Bien que la persistance du virus n'entraîne pas de lyse ou de dommages tissulaires immédiats, l'infection n'est pas sans conséquences (Jaïdane and Hober 2008). Outre la destruction directe des cellules β du pancréas par le virus, l'infection persistante par CV-B4 induit la production d'interféron α (IFN- α) qui pourrait initier la réaction auto-immune observée dans le DT1 (Stewart et al., 1993). La réplication permanente du virus serait également un facteur favorisant l'inflammation du pancréas, et le recrutement de lymphocytes T autoréactifs (Hyoty 2002). Des travaux in vitro ont également montré que la persistance de CV-B4 E2 dans des cellules pancréatiques modifiait l'expression de gènes cellulaires et de micro-ARN (Sane et al., 2013 ; Engelmann et al., 2017).

La persistance de CV-B au niveau des intestins est possible, bien que peu étudiée (Alidjinou et al., 2014, Riabi et al., 2012).

La persistance des CV-B est documentée dans la cardiomyopathie dilatée et l'encéphalite chronique. La persistance de CV-B chez les patients avec un diabète de type 1 est fortement suspectée.

Diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une pathologie qui se caractérise par une hyperglycémie chronique, due à une perte de fonction de l'insuline, hormone hypoglycémisante.

L'insuline

L'insuline est stockée dans les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sous formes de granules, dont la sécrétion est stimulée par le glucose sanguin. Avant d'être stockée dans ces granules, l'insuline doit subir, après sa traduction, plusieurs étapes de maturation. L'insuline est d'abord traduite sous la forme de préproinsuline, encore pourvue de son peptide signal, et du peptide C. La première étape de la maturation sera l'acheminement de la préproinsuline vers l'appareil de Golgi, accompagné du clivage du peptide signal par une enzyme, la signal peptidase (SPP)(Kronenberg-Versteeg et al., 2018). Le résultat de ce clivage sera la proinsuline, composée des

trois chaînes A, B et C, et le peptide signal qui sera détruit par le protéasome (Kronenberg-Versteeg et al., 2018). L'adressage de la préproinsuline, et le clivage du peptide signal, sont accompagnés de la formation de deux ponts disulfure entre les chaînes A et B de la proinsuline.

Dans l'appareil de Golgi, un autre clivage va être effectué. La pro-hormone convertase 2 (PC2) codée par le gène *PCSK2*, va cliver la proinsuline entre les chaînes A et C, entre les résidus Lys 64 et Arg 65 (Smeekens et al., 1992 ; Davidson et al., 1988). A ce stade de la maturation, les chaînes A et B sont reliées par deux ponts disulfures. La chaîne B est encore liée à la chaîne C, tandis que la chaîne A ne l'est plus. L'insuline encore immature va ensuite être acheminée par des granules. C'est dans ces granules d'insuline qu'aura lieu le dernier clivage de la proinsuline. La pro-hormone convertase 1 (PC1), codée par le gène *PCSK 1*, va permettre la séparation des chaînes B et C, en clivant entre les résidus Arg 31 et Arg 32. Ce deuxième clivage permettra la formation d'insuline mature, et de peptide C (**Figure 3**) (Smeekens et al., 1992 ; Davidson et al., 1988).

Les granules d'insuline ainsi formés vont être stockés dans les cellules β . Le glucose sanguin entre dans la cellule β par le transporteur GLUT-2, et la glycolyse a lieu. L'augmentation du ratio ATP/ADP due à une glycolyse plus importante entraînera ensuite la fermeture de canaux à potassium sensibles à l'ATP, ce qui cause la dépolarisation de la membrane plasmique. Les canaux calciques voltages dépendants s'ouvrent alors et entraînent l'exocytose des granules d'insuline (Henquin 2000).

L'insuline ainsi libérée va ensuite se fixer à son récepteur spécifique dans différents tissus, principalement le foie et le tissu adipeux, mais également au niveau du tissu musculaire. L'insuline induit la translocation du transporteur de glucose GLUT-4 au niveau de la membrane des cellules cibles. L'expression de GLUT-4 va permettre l'absorption du glucose sanguin dans les cellules hépatiques et adipeuses notamment. Ce phénomène s'accompagne d'une inhibition de la glycogénèse, et d'une augmentation de la synthèse du glycogène (Lee and Pilch, 1994).

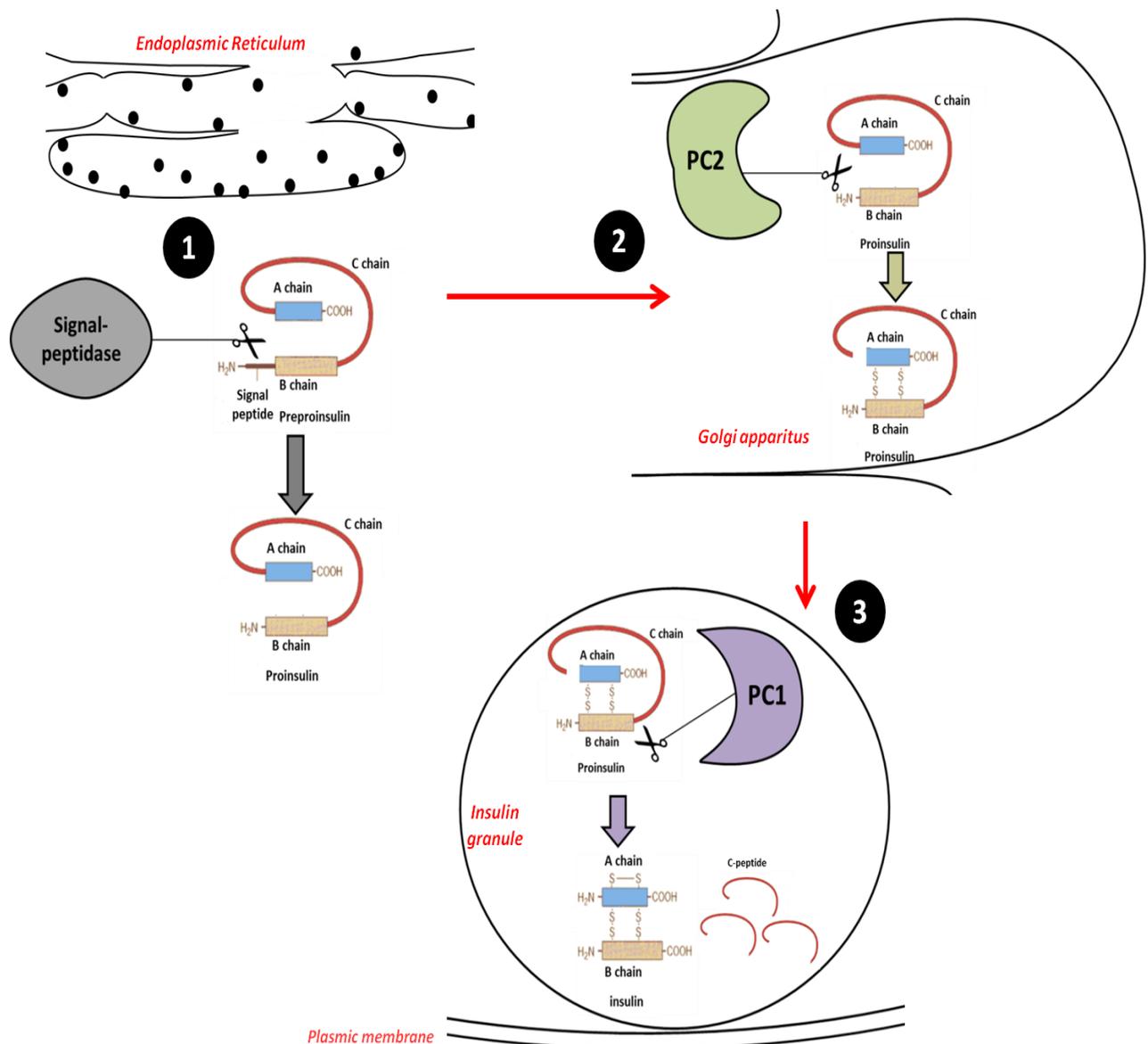


Figure 3 : Maturation de l'insuline. L'insuline subit de nombreuses modifications post-traductionnelles avant d'être biologiquement active. **1)** L'ARNm du gène de l'insuline est traduit au niveau du réticulum endoplasmique. La préproinsuline, produit de cette traduction, est composée de trois chaînes (A, B et C), et d'un peptide signal. Le résultat de ce clivage sera la proinsuline, composée des chaînes A, B et C. **2)** La proinsuline est acheminée jusqu'à l'appareil de Golgi. Elle y sera clivée par une enzyme, la pro-hormone convertase 2 (PC2) entre les chaînes A et C. De plus, des ponts disulfures vont se former entre les chaînes A et B. **3)** La proinsuline est ensuite acheminée vers des granules d'insuline en périphérie de la cellule. Dans ces granules, une enzyme la pro-hormone convertase 1 (PC1) clivera la proinsuline entre les chaînes B et C. Il en résultera l'insuline mature, biologiquement active, composée uniquement des chaînes A et B, reliées par des ponts disulfure. Le c-peptide, composé de la chaîne C de la proinsuline, est un produit dérivé de cette maturation.

D'après Snustad et al 1997

L'ensemble des phénomènes induits par l'insuline va permettre la diminution de la glycémie, d'où l'effet hypoglycémiant de l'insuline. L'insuline est sécrétée lorsque le taux de glucose sanguin augmente. Sous l'action naturelle de l'insuline (*hormone hypoglycémiante*) et du glucagon (*hormone hyperglycémiante*), la glycémie se stabilisera à une concentration de glucose proche de 1g.L^{-1} . Une hyperglycémie est caractérisée lorsque le taux de glucose sanguin à jeun dépasse 1.26g.L^{-1} (ou 2g.L^{-1} le reste du temps).

Dans le cas du DT1, les patients sont en hypoinsulinémie, ce qui aboutit à une hyperglycémie chronique. La déficience en insuline est due à la destruction, ou à la perte de fonction des cellules β des îlots de Langerhans (Katsarou et al., 2017). Outre les symptômes observables au début de la pathologie (polyurie, polydipsie et asthénie notamment), l'hyperglycémie chronique qui caractérise le DT1 a plusieurs effets secondaires graves, tels que des risques accrus d'insuffisance rénale, de cécité et de neuropathie (Soedamah-Muthu et al., 2014).

Les seuls traitements actuellement dispensés pour le DT1 visent essentiellement à un contrôle de la glycémie, soit par un rétablissement de la sécrétion d'insuline dans le cas de la greffe d'îlots de Langerhans (Vantighem et al., 2009), soit par l'injection périodique d'insuline

Pathogénèse du diabète de type 1

Le DT1 est une pathologie multifactorielle, dont les causes ne sont pas encore établies. Des prédispositions génétiques, au déclenchement comme à la protection du DT1 sont connues ; plus de 50 régions génomiques sont associées au DT1 (Horne et al., 2016). La prédisposition génétique majeure au DT1 concerne les gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Buzzeti et al., 1998). D'autres variants de ces gènes confèrent, à l'inverse, une protection contre le DT1. Bien que la fonction de ces gènes soit connue, leur implication dans la pathogénèse du DT1 n'est pas entièrement connue (Atkinson and Eisenbarth 2001). La génétique n'est cependant pas suffisante pour expliquer le déclenchement de la pathologie, comme le prouvent différentes études sur le DT1 chez des jumeaux homozygotes, pour lesquels une concordance de 30 à 40% est observée (Kaprio et al., 1992 ; Petersen et al., 1997 ; Kumar et al., 1993 ; Olmos et al., 1988).

Des facteurs environnementaux sont nécessaires au déclenchement du DT1. De nombreux facteurs environnementaux ont été suspectés dans la pathogénèse du DT1, le principal étant l'infection par un virus (Principi et al., 2017 ; Hober and Sauter 2010). Une association mineure entre le DT1 et l'infection par un virus a été retrouvée pour certains parechovirus. Plus particulièrement, des anticorps dirigés contre le virus Ljungan ont été retrouvés chez des enfants atteints de DT1 (Nilsson et al., 2015). Les infections à rotavirus sont également suspectées, bien que l'association entre les rotavirus et le DT1 soit discutée (Ataei-Pirkooh et al., 2019 ; Honeyman et al., 2014). Des virus de la

famille des *Herpesviridae* sont associés au DT1, c'est le cas notamment du virus d'Epstein-Barr (Bian et al., 2016). Les principaux virus associés au DT1 restent cependant les Entérovirus. Une méta-analyse de 24 publications, regroupant des tests effectués sur plus de 1900 patients diabétiques et 2500 sujets contrôles, conclut à une association significative entre les infections à entérovirus et le DT1, avec un rapport de chances de 3.7 (Yeung et al., 2011).

Parmi les entérovirus associés au DT1, les CV-B font partie des plus fréquemment détectés, dont le CV-B4 (Moya-Suri et al., 2005 ; Roivainen et al., 1998 ; Jaidane and Hober 2008). Le rôle de CV-B4 dans la pathogénèse du DT1 n'est pas encore complètement élucidé, mais de nombreux mécanismes sont évoqués. Une lyse directe des cellules β par le virus est suspectée, ce qui entraînerait le défaut de sécrétion d'insuline. Cette hypothèse est également avancée dans le cas du diabète fulminant (Kobayashi et al., 2011).

Une autre hypothèse est la stimulation de l'auto-immunité lors de l'infection par CV-B, résultant en une destruction des cellules β lors de l'infection, par l'intermédiaire de l'auto-immunité (Op de Beeck and Eizirik, 2016 ; Bergamin and Dib, 2015 ; Petzold et al., 2015). L'existence d'un tel mécanisme est soutenue par une association entre l'infection par des entérovirus et la présence d'auto-anticorps dirigés contre l'enzyme GAD65 (glutamic acid decarboxylase 65) (Frisk and Tuvemo, 2004). D'une manière plus générale, l'infection à entérovirus a été associée aux auto-anticorps dirigés contre les îlots de Langerhans (Lind et al., 2018 ; Sioofy-Khojine et al., 2018 ; Laitinen et al., 2014). Un mimétisme moléculaire entre la protéine 2C de CV-B4 et la GAD65 est évoqué pour expliquer cette association mais cette hypothèse est controversée (Kukreja and Maclaren, 2000, Jaidane et al., 2010).

D'autres auto-antigènes sont documentés dans le DT1, tels que ceux dirigés contre la proinsuline et l'insuline, ou encore la tyrosine phosphatase IA-2 (Petzold et al., 2015). Le rôle suspecté de l'infection par CV-B dans la réponse immune dirigée contre ces auto-antigènes est double. Dans un premier temps, l'infection de cellules β par CV-B, et la lyse de ces cellules, provoque une diffusion des épitopes cellulaires, pouvant stimuler des cellules auto-réactives proches (Op de Beeck and Eizirik, 2016). De plus, l'infection par un entérovirus induit une forte réponse inflammatoire, caractérisée par la sécrétion de TNF- α , d'interferon- α et d'IL-1 β (Vreugendhil et al., 2000 ; Hober and Sauter 2010). L'inflammation locale peut alors activer des lymphocytes T auto réactifs. Il s'agit de l'activation « en passant » de cellules auto-réactives (Hober et al., 2013).

L'implication de l'infection à entérovirus dans l'auto-immunité ne s'arrête pas là. CV-B4 est capable d'infecter et de persister dans des cellules thymiques, avec comme effet une augmentation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH1), et une diminution de l'expression de l'IGF2 (insulin-like growth factor 2) (Jaidane et al 2012 ; Brillot et al., 2004 ; Michaux et al., 2015). Une telle infection perturbe la maturation des lymphocytes T (Brilot et al., 2008). De

plus, l'IGF2 est la protéine de la famille de l'insuline la plus présente dans le thymus qui joue un rôle essentiel dans la tolérance vis-à-vis de l'insuline (Geenen and Brilot, 2003). Une infection persistante à CV-B4 du thymus entraînerait donc une rupture de la tolérance immunitaire vis-à-vis des cellules β sécrétrices d'insuline (Michaux et al., 2015 ; Jaidane et al 2012).

Des marqueurs d'infection à entérovirus ont été retrouvés au long cours chez des patients diabétiques, soutenant l'hypothèse d'une infection persistante à entérovirus. De l'ARN entéroviral et la protéine de capside VP1 ont été retrouvés dans différents types cellulaires plus fréquemment chez les patients diabétiques que chez les sujets contrôles, notamment dans des cellules sanguines, intestinales et pancréatiques (cellules canalaies pancréatiques et îlots de Langerhans) (Alidjinou et al., 2015 ; Oikarinen et al., 2012 ; Krogvold et al., 2015 ; Ylipaasto et al., 2004, Hyoty 2016 ; Anagandula et al., 2014). Des protéines cellulaires telles que l'IFN- α et la protéine kinase R (PKR), qui sont synthétisées en réponse à une infection virale, sont également observées dans le pancréas de diabétiques (Dotta et al., 2007 ; Richardson et al., 2009). Des signes indirects de l'infection par des entérovirus ont également été observés chez les diabétiques. Des anticorps neutralisants dirigés contre CV-B4, ont été détectés dans la salive de patients diabétiques (Badia-Boungou et al., 2017). Des anticorps reconnaissant CV-B4 facilitent l'infection de cellules sanguines par ce virus (Hober et al., 2012). La facilitation de l'infection de CV-B4 par des anticorps concerne essentiellement les monocytes, et induit la sécrétion d'IFN- α (Alidjinou et al., 2015 viruses ; Hober et al., 2001). Des anticorps facilitant l'infection de CV-B4 ont été détectés dans le sang de patients diabétiques, plus fréquemment que dans celui des contrôles (Hober et al., 2002). Il a été démontré que les anticorps facilitant l'infection de CV-B4 se fixent à la protéine VP4 du virus (Chehadeh et al., 2005).

La persistance de CV-B4 a été obtenue dans les cellules sanguines, intestinales et pancréatiques (Sane et al., 2013, Aldjinou et al., 2015, Alidjinou et al., 2014; Oikarinen et al., 2008. Chehadeh et al 2000). Une présence prolongée du virus dans les cellules serait un facteur exacerbant les mécanismes d'inflammation et d'activation en passant (Alidjinou et al., 2014 ; Hober et al., 2013). Lorsque les cellules β sont infectées de manière persistante, l'IFN- α est sécrété en quantité importante, et les cellules endocrines présentent des antigènes des cellules β aux cellules immunitaires (Rodriguez-Calvo 2019). L'interféron- α contribue à l'inhibition de la sécrétion d'insuline (Lombardi and Tomer, 2017). D'autre part, l'infection par CV-B4 de certaines cellules, notamment les cellules α des îlots de Langerhans et les cellules canalaies pancréatiques, empêcherait la régénération des cellules β (Thorel et al., 2010, Sane et al., 2013). Ainsi, l'infection persistante du pancréas par des CV-B aggraverait l'auto-immunité dans l'organe. L'infection joue également un rôle direct dans la pathologie, puisqu'elle diminue la sécrétion d'insuline par les cellules β (**Figure 4**).

Récemment, de nouveaux acteurs de la pathogénèse du DT1 ont été identifiés. Une dérégulation des micro-ARNs (miRNAs) des cellules pancréatiques, en réponse à l'infection par des entérovirus

a également été reportée, altérant notamment la sécrétion de cytokines, le cycle cellulaire, l'apoptose et l'autophagie, ainsi que l'inflammation et l'immunité (Isaacs et al., 2016 ; Engelmann et al., 2017 ; Engelmann et al., 2018). Des rétrovirus endogènes humains (HERV) participeraient également à la pathogénèse du DT1 (Levet et al., 2017).

Les rétrovirus endogènes humains sont des séquences d'ADN viral qui se sont intégrées au génome humain au cours de l'évolution. Ces séquences, qui représentent environ 8% du génome humain, sont le plus souvent non exprimées (Dolei 2018). Dans certaines situations, de telles séquences rétrovirales sont néanmoins exprimées. C'est le cas lors de la grossesse : la syncytine est une protéine d'origine rétrovirale qui permet la formation du placenta (Dolei 2018). Des HERV sont également exprimés dans certains contextes pathologiques.

La principale pathologie à laquelle HERV-W a été associée est la sclérose en plaques (SEP). Des particules rétrovirales isolées de patients atteints de SEP ont permis d'établir le lien entre la pathologie et un rétrovirus (Perron et al., 1991). Des recherches plus avancées ont ensuite établi qu'un rétrovirus endogène HERV-W était impliqué dans la SEP (Perron and Lang, 2010). Plus particulièrement, l'effet pathogène de HERV-W Env était médié par sa protéine d'enveloppe HERV-W Env (Perron et al., 2005 ; van Horssen et al., 2016). HERV-W Env est un agoniste de TLR4, par le biais duquel la protéine induit une réponse inflammatoire, caractérisée par la sécrétion d'interleukine-6 et empêche la réparation des gaines de myéline (Duperray et al., 2015). Les mécanismes pathologiques associés à HERV-W Env incluent aussi une activation de l'auto-immunité. La protéine Env oriente la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire Th1 et exacerbe l'auto-immunité par l'activation des lymphocytes T d'une manière similaire à celle d'un super-antigène (Rolland et al., 2006, Sarasella et al., 2009, Perron et al., 2001).

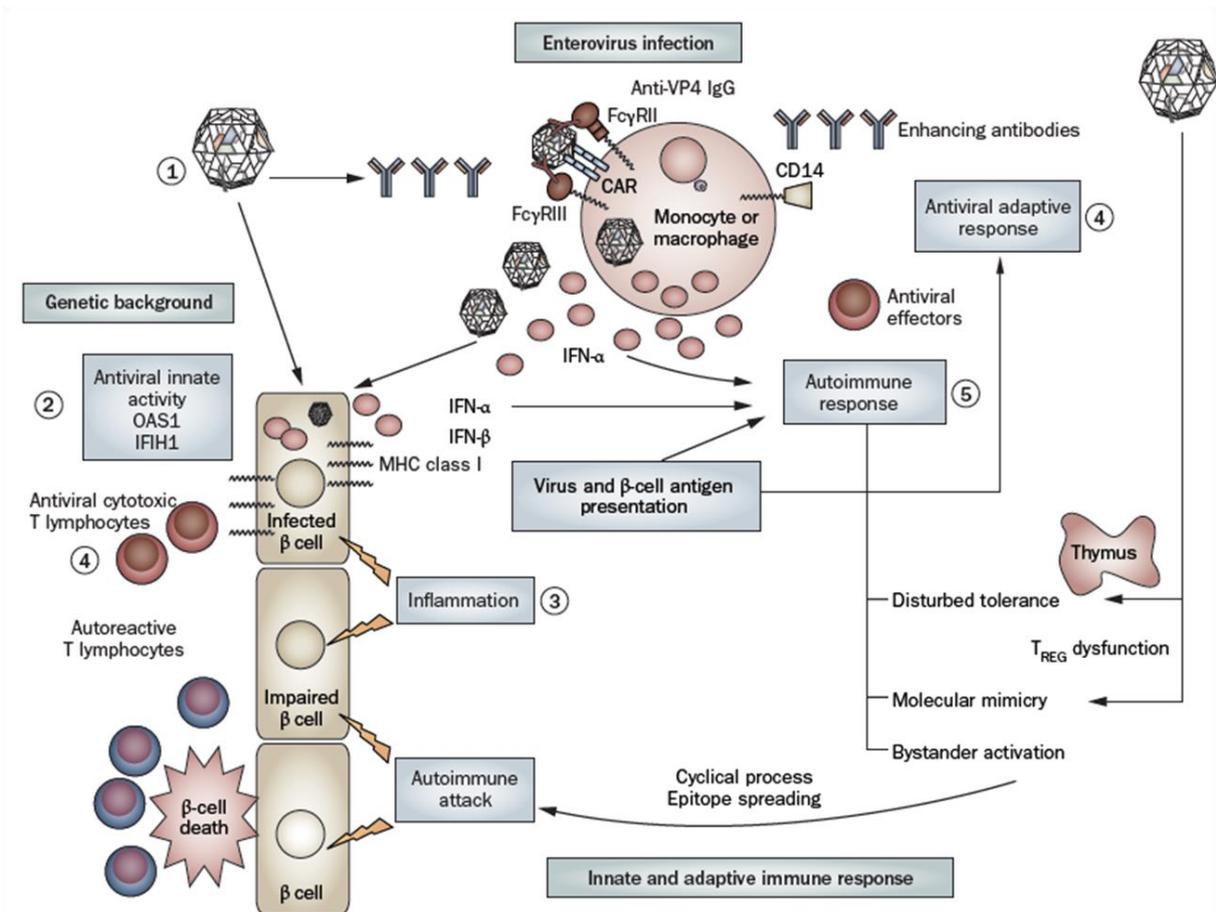


Figure 4 : Mécanismes viraux de la pathogénèse du DT1. Les monocytes et macrophages sont infectés avec l'aide d'anticorps facilitants, et peuvent disséminer le virus dans l'organisme, notamment jusqu'aux cellules β qui peuvent être infectées de manière aiguë ou persistante. Les monocytes infectés participent aussi à la pathogénèse par la sécrétion d'IFN- α qui stimule l'auto-immunité. 2) Des prédispositions génétiques de l'hôte jouent un rôle dans la pathogénèse du DT1. Des gènes de l'immunité innée sont particulièrement concernés. 3) L'infection par des entérovirus induit la production d'IFN- α et d'IFN- β , déclenche l'apoptose dans les cellules infectées, et induit l'expression du CMH de classe 1 et la production de chimiokines attirant les lymphocytes T qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. 4) Des infections entérovirales stimulent l'immunité acquise, promouvant ainsi la réponse auto-immune dirigée contre les cellules β . 5) Suite à l'infection virale, l'inflammation et la présentation des antigènes des cellules β stimulent l'immunité. Une tolérance immune altérée, le mimétisme moléculaire et l'activation en passant des lymphocytes participent à la destruction auto-immune des cellules β .

D'après Hober and Sauter 2010

HERV-W Env a été récemment étudié dans le contexte du DT1. Des anticorps dirigés contre HERV-W ont été retrouvés chez des patients diabétiques (Niegowska et al., 2019). La protéine Env a été

retrouvée en plus forte abondance dans le sérum de patients diabétiques que dans celui de sujets contrôles. L'ARNm de HERV-W Env est également plus exprimé dans les CMN de diabétiques que dans celles de sujets contrôles. La protéine est retrouvée dans le pancréas exocrine également, où la quantité de protéine Env est corrélée positivement à la durée du DT1 (Levet et al., 2017). De la même façon, l'expression de Env dans les lésions cérébrales retrouvées dans la SEP augmentait également avec la durée de la pathologie (van Horssen et al., 2016). En plus de ses propriétés inflammatoires et auto-immunes, la protéine Env a un impact direct sur les cellules endocrines, mis en évidence par la diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β traitées avec Env (Levet et al., 2017). HERV-W Env existe en de multiples copies dans le génome humain. Une copie pathogène spécifique n'a pas encore été identifiée dans le DT1 (Thomas et al., 2018).

Si les mécanismes conduisant à une activation des HERV ne sont pas encore tous élucidés, il a cependant été reporté qu'une infection virale par HHV-6A (Human Herpesvirus 6A) pouvait activer l'expression de HERV-W Env dans des cellules mononuclées du sang périphérique. L'activation observée est spécifique de HHV-6A, et n'est pas observée lors de l'infection par des virus de la même famille (HHV-6B notamment) (Charvet et al., 2018).

Objectifs

Les coxsackievirus-B sont associés au DT1 comme le prouvent les études épidémiologiques. De nombreux mécanismes sont proposés pour expliquer le rôle des CV-B dans le DT1. D'une part, le virus pourrait avoir un impact direct sur la cellule β , telle qu'une lyse cellulaire, et d'autre part, il induirait une réponse inflammatoire et auto-immune, par le biais de l'infection de différents types cellulaires tels que les cellules sanguines, le thymus et le pancréas, dirigée contre les cellules productrices d'insuline, déclenchant ainsi la pathologie. La persistance du virus dans le pancréas est souvent présentée comme un facteur amplifiant la réponse auto-immune. Les hypothèses concernant les mécanismes pathologiques s'appuient sur ces observations chez les patients ou dans des modèles animaux de DT1. De plus, les études *in vitro* permettent de détailler davantage les interactions entre le virus et les cellules.

Des rétrovirus endogènes humains ont récemment été incriminés dans le DT1, plus particulièrement le rétrovirus HERV-W. La protéine d'enveloppe de HERV-W participe à la pathologie en induisant une réponse inflammatoire et auto-immune, et en inhibant la production d'insuline par les cellules β . Ces rétrovirus, habituellement non exprimés, sont activables par des virus tels que HHV-6.

Plusieurs problématiques se dégagent quant à l'impact de CV-B4 sur les cellules. La persistance de CV-B4 dans des cellules pancréatiques canalaire induit une perte d'expression de PDX1, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des cellules canalaire en cellules sécrétrices d'insuline. Néanmoins, l'impact de l'infection persistante sur la sécrétion d'insuline reste à préciser. Etant donné, la relation entre le DT1, et les infections à entérovirus, plus particulièrement à CV-B, l'implication de HERV-W Env dans le DT1, et la capacité de certains virus à activer l'expression de HERV-W Env, une possible relation entre CV-B et HERV-W, dans le contexte du DT1, est à étudier.

Les objectifs de ce travail sont :

- I) D'étudier la persistance de CV-B4 dans des cellules pancréatiques primaires humaines
- II) D'étudier l'impact de la persistance de CV-B4 sur la sécrétion d'insuline de cellules pancréatiques
- III) De déterminer si l'infection de cellules humaines par CV-B4 active l'expression du gène d'enveloppe de HERV-W

Matériel et Méthodes

Lignées cellulaires

La lignée de cellules β INS 1 a été fournie par le Professeur ABDERRAHMANI (UMR 8199, Université Lille). La lignée INS 1 a été cultivée en milieu RPMI complétementé avec 10% de SVF, 100U de pénicilline et 100 μ g de streptomycine, 1% de L-Glutamine, 1% de sodium pyruvate (Invitrogen) et 50 μ M de 2-mercaptoéthanol (Sigma).

La lignée Hep-2 (BioWhittaker, Verviers, Belgique) a été cultivée en milieu MEM complétementé avec 10% de SVF, 100U de pénicilline et 100 μ g de streptomycine, et 1% de L-glutamine.

Les lignées ont été repiquées chaque semaine. Les cellules ont été détachées du flacon à l'aide de la trypsine (Sigma), et une portion des cellules a été mise en culture dans un nouveau flacon avec du milieu adapté.

Cellules pancréatiques humaines

Travail réalisé en collaboration avec V. Gmyr, J. Kerr-Conte, F. Pattou

U 1190 « Recherche translationnelle sur le diabète », Université de Lille

Conformément aux réglementations et aux règles d'éthiques en vigueur, les cellules pancréatiques humaines primaires, collectées à partir du pancréas de donneurs en état de mort cérébrale, ont été obtenues comme un produit dérivé de l'isolement d'îlots de Langerhans. La méthode qui a été utilisée est celle de Ricordi (Ricordi et al., 1989) utilisant la collagénase, comme précédemment décrite dans nos travaux (Sane et al., 2013). Le culot obtenu a été lavé dans du HBSS (Gibco) puis mis en culture dans des plaques 6 puits avec du milieu DMEM (Gibco) avec 3g.L⁻¹ de glucose, 10% de sérum de veau fœtal, et 1% d'insuline transferrine sélénium (ITS, Sigma-Aldrich). La généticine (G418, Sigma-Aldrich) a été utilisée pour limiter la croissance des fibroblastes. Après 3 semaines de culture, les cellules se sont dé/trans-différenciées en cellules exprimant la cytokératine19 (CK19) (Gmyr et al., 2000). Pour induire la formation d'agrégats cellulaires (ICA : IsletslikeCellAggregates), le milieu a été enlevé, et le tapis cellulaire lavé. Les cultures ont ensuite été incubées 2 minutes en présence de trypsine à 0.05%. La trypsine a ensuite été éliminée, puis du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) F12 sans sérum, complétementé avec 1% de sérum albumine bovine (BSA) et 1% d'insuline transferrine sélénium (ITS), a été ajouté. La culture a été poursuivie jusqu'à formation des ICAs, 24 à 48H plus tard. Les ICAs ont été collectés et cultivés dans des inserts (Thermo Fisher Scientific) en plaques 24 puits. L'Uptiblue (Interchim) et le bleu trypan (Thermo Fisher Scientific) ont été utilisés pour déterminer respectivement l'activité métabolique des cellules et leur viabilité.

Macrophages dérivés de CMN humaines

Du sang a été prélevé de donneurs par l'Etablissement français du Sang (EFS) (Lille, France), en accord avec les règles de la déclaration d'Helsinki de 1975 (révision de 2008). Le consentement écrit des donneurs a été obtenu par l'EFS, et les donneurs ont été informés que le sang serait utilisé à des fins de recherche.

Les cellules mononucléées du sang périphérique (CMN) ont été isolées à partir d'une poche de concentré leuco-plaquettaire à l'aide du gradient de densité Ficoll-Hypaque® PLUS (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). 20mL de sang ont été déposés au-dessus de 20mL de Ficoll-Hypaque® PLUS dans des tubes de 50mL. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 1000g pendant 40 minutes. A la fin de la centrifugation, 4 phases ont été observables dans le tube : un culot d'érythrocytes a été obtenu, au-dessus duquel se trouve le gradient de densité, surmonté d'un anneau blanc et épais contenant les CMN. Le plasma se trouve dans le surnageant. Les anneaux de CMN ont été récupérés, puis lavés 2 fois dans du milieu RPMI. Les CMN obtenues ont été suspendues dans du milieu RPMI, puis mises en culture dans des plaques 6 puits à raison de 10^7 cellules/puits. Après 16H d'incubation, les monocytes ont adhéré au puits, alors que les autres CMN se trouvent dans le surnageant. Les monocytes ont été lavés 2 fois avec du milieu RPMI, puis 2mL de milieu sans sérum Macrophage-SFM (Gibco), complémenté avec $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cyclosporine A et 20ng.mL^{-1} de M-CSF (macrophage colony stimulation factor). Après 24H d'incubation, le milieu a été enlevé, puis 2mL de milieu sans serum complémenté avec 20ng.mL^{-1} de M-CSF ont été ajoutés. Après 6 jours d'incubation, les monocytes étaient différenciés en macrophages.

Virus

La souche diabétogène CV-B4 E2 a été fournie par Ji-Won Yoon (Julia McFarlane Diabetes Research Center, Calgary, Alberta, Canada), et a été propagée en cellules HEp-2. Les particules virales ont été libérées des cellules par 3 cycles de congélation-décongélation, puis le surnageant a été récupéré après une centrifugation à 2000g pendant 10 minutes à 4°C. Les stocks de virus ont été conservés à -80°C.

La souche CV-B4 JVB a été fournie par J Almond (Aventis Pasteur, Marcy l'Etoile, France). CV-B4 JVB a été propagé de la même façon que CV-B4 E2.

Détermination du titre viral

Les surnageants de culture infectées ont été récoltés, puis centrifugés à 400g pendant 10 minutes, puis le surnageant a été prélevé, et le culot éliminé. Le surnageant a été conservé à -80°C en attente du titrage. Des cellules HEp-2 ont été trypsinées et déposées en plaques 96 puits à raison de 10^4 cellules par puits, puis incubées 24H. Les surnageants à titrer ont été ensuite dilués en cascade au

1/10^{ème}, puis 100µL de chaque dilution ont été déposés en duplicata sur les cellules HEp-2. Les plaques ont été incubées 48 à 72H à 37°C et 5% de CO₂. L'effet cytopathique (ECP) a ensuite été lu à l'aide d'un microscope à contraste de phase Olympus CKX41. Le titre viral a été calculé avec la formule de Spearman-Kärber. Les résultats sont exprimés en TCID₅₀.mL⁻¹.

Infection des cellules

Des flacons de cellules INS1 ont été inoculés avec 10³ TCID₅₀ de CV-B4 E2. Les cultures ont été lavées 24h post-inoculation, puis tous les 2 à 3 jours au cours du suivi. Des surnageants de culture et des lysats de cellules ont été prélevés tout au long de la culture.

Les cultures de macrophages ont été inoculées avec CV-B4 E2 ou CV-B4 JVB à une MOI de 1 ou 10. Les cellules ont été lavées 5 fois après 6H d'incubation.

Les cultures de cellules pancréatiques primaires ont été inoculées avec CV-B4 E2 à une MOI de 1, 0.1 ou 0.01. Les cellules ont été lavées 5 fois après 6H d'incubation.

Pour obtenir une infection persistante, des cellules pancréatiques primaires ont été cultivées dans des flacons de 25cm² jusqu'à confluence, puis inoculées avec 2.10³ TCID₅₀ CV-B4 E2. Les cultures ont été lavées chaque jour lors de la crise aiguë suivant l'infection. Les cellules ont ensuite été lavées tous les 2 à 3 jours tout au long du suivi. Des surnageants et des lysats de cellules ont été prélevés tout au long de la culture.

Test de viabilité à l'uptiblue et au bleu trypan

Pour mesurer l'activité métabolique des cellules, l'uptiblue (interchim®) a été ajouté conformément aux instructions du fabricant. Les cellules ont été incubées pendant 6H à 37°C, 5% de CO₂ avec l'uptiblue. Le surnageant a été récupéré, et l'absorbance a été lue à 570nm et 600nm à l'aide du lecteur Multiskan GO (Thermo). La différence entre les absorbances aux deux longueurs d'onde constitue l'indice de viabilité de la culture.

Le bleu trypan a été inoculé à des cellules, qui ont ensuite été observées au microscope optique dans les 15 minutes, afin de discriminer les cellules mortes et vivantes.

Extraction d'ADN et d'ARN

L'ADN et l'ARN des cellules ont été extraits simultanément à l'aide du kit allprep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen). Les cellules ont été grattées et culottées, avant d'être lysées dans 350µL de tampon de lyse RLT Plus, auquel 1% de β-mercaptoéthanol a été ajouté. L'isolement se fait ensuite selon le protocole du fournisseur. L'ARN et l'ADN extraits ont été conservés à -20°C.

L'ADN a été quantifié par lecture de l'absorbance à 260nm. 2µL de chaque échantillon ont été déposés sur une plaque µDrop (Thermo). La lecture a été effectuée par le lecteur Multiskan GO (Thermo). L'absorbance a été lue à 260 et 280nm. Le rapport entre l'absorbance à 260nm et

l'absorbance à 280nm permet d'évaluer la pureté de l'ADN et de l'ARN. Les échantillons utilisés avaient un rapport A260/A280 de $1,8 \pm 0.05$. L'ADN a été dosé en utilisant la corrélation indiquant $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'ADN pour une $A_{260} = 1$.

L'ARN a été quantifié selon la même méthode. Les échantillons utilisés avaient un rapport A260/A280 de 2 ± 0.05 . L'ARN a été dosé en utilisant la corrélation indiquant $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ d'ARN pour une $A_{260} = 1$.

RT-PCR suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose

Pour détecter l'ARN viral intracellulaire, les cellules ont été lavées puis l'ARN a été extrait. Une RT-PCR en une étape, ciblant l'ARN entéroviral et la β -actine comme témoin de charge, a été effectuée avec le kit One step RT-PCR (Thermo Scientific). Le programme de PCR utilisé était: 30 minutes à 50°C pour la rétro-transcription, 2 minutes à 94°C pour la dénaturation initiale, puis 35 cycles de PCR constitués de : 30 secondes de dénaturation à 94°C , 45 secondes d'hybridation à 55°C et 45 secondes d'élongation à 68°C . Une élongation terminale de 10 minutes à 68°C a été ensuite réalisée, avant de conserver les échantillons à 4°C . La PCR a été effectuée avec le thermocycleur Perkin elmer applied Geneamp PCR System 2400. Les amorces utilisées sont listées dans le **tableau 2**.

RT-PCR Quantitative

La RT-PCR en temps réel a été effectuée avec le kit SYBR Green Supermix (Biorad) et le thermocycleur Mx3000P pour mesurer l'expression de l'ARNm de PCSK1 et PCSK2. Le kit cDNA synthesis kit (Invitrogen) a été utilisé pour effectuer la rétro-transcription, en utilisant des oligo-dT comme amorces de rétro-transcription, conformément aux instructions du fabricant. Les amorces utilisées en PCR ont été listées dans le tableau 1. Toutes les paires d'amorces ont été testées pour s'assurer qu'un unique produit de PCR de la taille attendue était amplifié. L'eau nucléases-free a été utilisée comme contrôle négatif dans tous les tests. L'expression relative a été calculée après normalisation avec le gène de la β -actine, qui a été utilisé comme gène de référence.

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées

	<i>Target</i>	<i>Sequence</i>
Beta-actin	<i>Forward</i>	5'-GGCACTCTTCCAGCCTTCCT-3'
	<i>Reverse</i>	5'-GCAATGCCAGGGTACATGGT-3'
CV-B4 E2	<i>Forward</i>	5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'
RLPO	<i>Forward</i>	5'-ACCTCCTTTTTCCAGGCTTT-3'
	<i>Reverse</i>	5'-CCCACCTTTGTCTCCAGTCTTG-3'
Insulin	<i>Forward</i>	5'-TGCATCAGAAGAGGCCATCA-3'
	<i>Reverse</i>	5'-CGTTCCCCGCACACTAGGTA-3'
CK19	<i>Forward</i>	5'-CCAGCCGGACTGAAGAATTG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-TGGGCTTCAATACCGCTGAT-3'
PCSK1	<i>Forward</i>	5'-TATGACCCATTGGCCAATAACC-3'
	<i>Reverse</i>	5'-TTCCTTTTCAGCCAACAGTAC-3'
PCSK2	<i>Forward</i>	5'-CGAAACCAGCTTCACGATGAG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-ACGCCGGCTTAGCAAAATGGA-3'
HERV-W Env	<i>Forward</i>	5'-GTATGTCTGATGGGGGTGGAG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-CTAGTCCTTTGTAGGGGCTAGAG-3'

Quantification de l'insuline, de la proinsuline et du c-peptide

Le surnageant des cultures de cellules canalaire et des cellules INS1 a été récupéré à différents temps post-inoculation.

L'insuline, la proinsuline et le c-peptide du surnageant ont été quantifiés respectivement à l'aide des kits ELISA Mercodia Mouse Insulin®, Mercodia Mouse Proinsulin®, et Mercodia c-peptide ELISA®, conformément aux instructions du fabricant.

Immunofluorescence

Des cellules ont été cultivées sur des lamelles en verre, dans des plaques 24 puits. Les cellules ont ensuite été fixées au paraformaldéhyde à 4%, puis perméabilisées au triton 0.1%. Le blocage des sites aldéhydes libres causé par le PFA a été effectué à l'aide d'une solution de NH₄Cl (50mM) et de glycine (20mM). La saturation des sites non spécifiques a été effectuée avec des sérums normaux issus des mêmes espèces que les anticorps secondaires utilisés (sérum normal de lapin pour le marquage de VP1, et sérum normal de chèvre pour le marquage de l'insuline). Les anticorps primaires (anticorps de souris anti-VP1 (DAKO®) et anticorps de cobaye anti-insuline (DAKO®)) ont été incubés pendant la nuit à température ambiante sous agitation. Les anticorps secondaires

(Anticorps de lapin anti-souris alexafluor 488 (abcam) pour le marquage VP1, anticorps de chèvre anti-cobaye alexafluor 594 (abcam) pour le marquage de l'insuline) ont été ajoutés et incubés pendant 1H à température ambiante. Les noyaux ont été marqués au Hoechst Dye (invitrogen). Les cellules ont été incubées avec 25µL Hoechst dye dilué au 1/500^{ème} pendant 15 minutes. Après chaque étape, les cellules ont été lavées au PBS tween 0.05%. Les lames ont été observées au microscope à fluorescence Leica Zeiss à l'objectif x40.

Quantification de la méthylation de l'ADN

La méthylation globale de l'ADN a été évaluée au moyen du kit methylflashmethylateddna quantification kit (colorimetric) (Epigentek). Toutes les solutions ont été diluées jusqu'à la concentration indiquée avec du tampon de lavage ME1 : ME5 au 1/1000^{ème}, ME6 au 1/2000^{ème}, et ME7 au 1/5000^{ème}.

Les témoins d'ADN méthylé (ME4) et non méthylé (ME3) ont été ajoutés dans chaque test.

80µL de solution ME2 (Binding solution) ont été déposés dans chaque puits, avant d'y ajouter 100 ng d'ADN de chaque échantillon en duplicata. La plaque a été ensuite incubée 1h30 à 37°C. 3 lavages avec 150µL de tampon de lavage ME1 ont été effectués, avant l'ajout de 50 µL de l'anticorps de capture ME5, incubé 1H à température ambiante. La plaque a été lavée comme précédemment. L'anticorps de détection ME6 a été ajouté à raison de 50µL par puits, et laissé à incuber 30 minutes à température ambiante. La plaque a été lavée 4 fois avec 150 µL de tampon de lavage ME1. 50µL de solution ME7 (enhancer solution) ont été ajoutés, et incubés 30 minutes à température ambiante. 100µL de substrat (ME8) ont été déposés dans chaque puits. La réaction a lieu jusqu'à ce qu'une coloration bleue nette apparaisse dans le puits contrôle, puis a été stoppé avec 100 µL de solution Stop ME9.

L'absorbance à 450 nm a été lue par le Multiskan GO (Thermo Scientific).

Le pourcentage de méthylation a été calculé selon la formule suivante :

$$5\text{-mC \%} = ((A_{\text{ech}} - A_{\text{ME3}}) / M_{\text{ADN}}) / ((A_{\text{ME4}} - A_{\text{ME3}}) * 2 / M_{\text{ADN}}) * 100$$

Avec :

A_{ech} = absorbance de l'échantillon

A_{ME3} = absorbance du témoin d'ADN non méthylé ME3

M_{ADN} = masse d'ADN introduite dans le puits

A_{ME4} = absorbance du témoin d'ADN méthylé ME4

Extraction de protéines

Travail réalisé en collaboration avec B. Charvet, S. Levet, J. Pierquin, H. Perron

Geneuro, Lyon

Les culots cellulaires ont été lysés dans 100µL de tampon d'extraction RIPA (Sigma Aldrich) complétement avec 1% de Foscholin 16 (Anatrace) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les échantillons ont été incubés 2H à 25°C sous agitation (120 rpm). La quantité totale de protéines extraites a été mesurée avec le kit « Proteinassayreagent » (Pierce).

Quantification de la protéine HERV-W Env

Travail réalisé en collaboration avec B. Charvet, S. Levet, J. Pierquin, H. Perron

Geneuro, Lyon

La protéine HERV-W Env a été détectée par Western Blot automatisé à l'aide de l'automate WES (ProteinSimple). Les tests ont été appliqués en utilisant les réactifs du fabricant conformément aux instructions. 4µL d'échantillon ont été mélangés avec le « fluorescent master mix » puis chauffé à 95°C pendant 5 minutes. Le tampon de saturation, le tampon de lavage, 20µg.mL⁻¹ d'anticorps primaire murin GN_mAb_Env01 (Geneuro), l'anticorps secondaire anti-anticorps de souris conjugué à le HRP (ProteinSimple), le module prêt à l'emploi « Mouse détection Module » DM-002, et le substrat chimioluminescent ont tous été déposés dans les puits désignés à cet usage dans les microplaques adaptées. La plaque a été placée dans l'appareil et les protéines ont été aspirées dans des capillaires individuels d'une cassette de 25 capillaires fournie par le fabricant. La séparation et l'immunodétection des protéines a été effectuée automatiquement sur chaque capillaire en utilisant les paramètres par défaut.

Digestion des protéines pour traitement en spectrométrie de masse

Travail réalisé en collaboration avec JP Gimeno, I Fournier et M Salzet

Laboratoire PRISM, Université de Lille, Plateforme Clic-imaging

Les échantillons de protéines cellulaires ont été digérés à la trypsine. Pour cela, les échantillons ont été incubés dans un tampon de dénaturation contenant 6M d'urée, et une sonication (3x1min) a été effectuée. Les échantillons ont été réduits par l'ajout de 1,4 dithiothréitol (40mM) et incubés à 55°C pendant 40 minutes. Les échantillons ont ensuite été alkylés par de l'idoacétamide à une concentration finale de 275 mM, puis incubés 40 minutes à l'obscurité. La Thiourée a ensuite été ajoutée à une concentration de 600mM, et la trypsine a finalement été ajoutée à une concentration de 40µg.mL⁻¹, avant une dernière incubation pendant la nuit à 37°C. La digestion a été stoppée avec

de l'acide formique à 2% (v/v). Les échantillons ont été dessalés avec une pointe de pipette C18 ZipTip (Millipore), et les peptides concentrés ont été séchés sous vide.

Spectrométrie de masse LC-MS/MS

Travail réalisé en collaboration avec JP Gimeno, I Fournier et M Salzet

Laboratoire PRISM, Université de Lille, Plateforme Clic-imaging

Les peptides obtenus après digestion des protéines ont été reconstitués avec une solution d'acétonitrile et d'acide formique (2%/0.1%). Les échantillons ont été séparés à un flux de 300nL/min, par un système de chromatographie de phase inverse (Easy-nLC 1000 UPLC system, Thermo) et par des colonnes capillaires C18 (Acclaim PepMap 100 C18, 75µm ID x 50 cm Thermo). L'éluat de la LC a été envoyé par électro spray dans la colonne d'analyse et un voltage de 1.7kV a été appliqué. Le système de chromatographie a été connecté à un spectromètre de masse Q Exactive (Thermo) configuré pour acquérir les données d'un top 10 MS². L'analyse des scans a été effectuée avec un pouvoir de résolution de 70000 FWHM (m/z 400). La portée des scans a été configurée de 300 à 1600 m/z.

Les données ont été analysées avec SEQUEST version 1.4.114 (Protéome Discover, Thermo). L'identification des protéines a été obtenue en utilisant les paramètres suivants : Tolérance de masse : ± 10ppm, Tolérance de masse des fragments : 0.6 Da, Max ΔCn = 0.05, Modification dynamique : oxydation/+15.995 Da (methionine), Enzyme : trypsine, 2 clivages manquants, Protéine FDR = 0.01. La recherche a été effectuée en utilisant la base de données UniprotKB/Swiss-Prot avec le filtre « *Rattus norvegicus* » (41604 séquences). L'identification des peptides a été acceptée si le FDR était inférieur à 1%. L'identification des protéines a été acceptée si au moins 2 peptides étaient identifiés, et si le FDR pouvait être inférieur à 1%.

Résultats

Partie I: Infection persistante à CV-B4 de cellules canalaire pancreatiques humaines primaires

I/ Les cellules canalaire pancreatiques humaines primaires peuvent être différenciées en ICA sécréteurs d'insuline

Les cellules canalaire humaines primaires ont été cultivées pendant 7 semaines. Lorsqu'elles étaient confluentes, les cellules ont été traitées avec de la trypsine, et le milieu a été changé pour induire la formation d'ICA comme décrit dans la partie matériel et méthodes (**Figure 5A, 5B**). L'expression de l'ARNm de CK19, marqueur moléculaire des cellules canalaire, a été mesurée par RT-qPCR, en normalisant avec le niveau d'ARNm du gène RLPO. Après la formation des ICAs, l'expression de l'ARNm de CK19 chute en comparaison à des contrôles non transformés (**Figure 5C**). A l'inverse, l'expression de l'ARNm de l'insuline, et le niveau de c-peptide dans le surnageant des cultures, augmentent après la formation d'ICA (**Figure 5D, 5E**).

II/ CV-B4 E2 peut persister dans des cellules canalaire humaines primaires *in vitro*

Des cellules canalaire pancreatique humaines primaires ont été obtenues de 7 donneurs décédés. Quand les cultures de cellules canalaire de 5 donneurs ont été inoculées avec CV-B4 E2, les cultures ont été sévèrement endommagées 3 jours p.i comparées aux contrôles non infectés (**Figure 6A**). Dans ces cultures, le titre viral variait de $10^{6.5}$ à $10^{7.5}$ TCID₅₀.mL⁻¹ (**Figure 6B**).

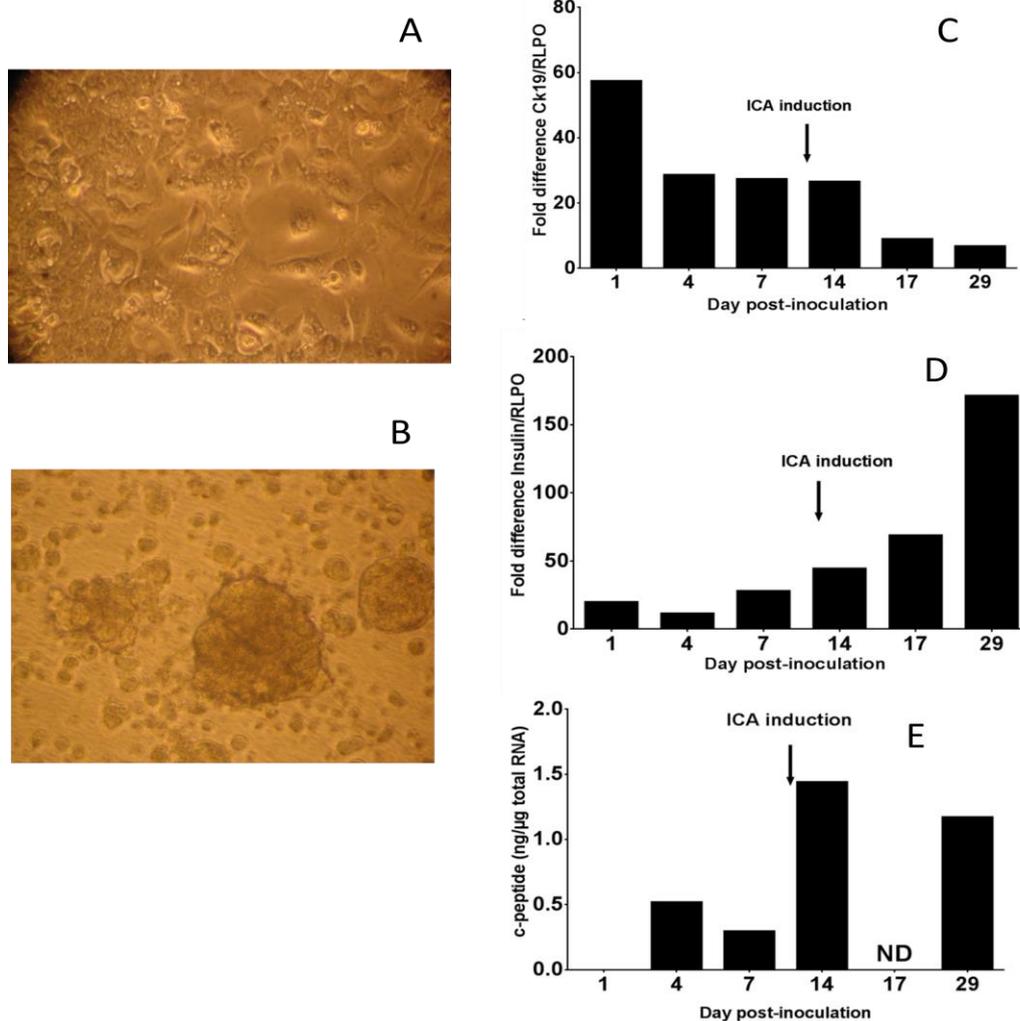


Figure 5 : Cellules canalaies pancréatiques humaines primaires. Les cultures de cellules canalaies (A) ont été exposées à la trypsine puis cultivées en milieu sans sérum pour induire la formation d'ICA (B) (Grossissement x40). Les niveaux d'expression de l'ARNm de CK19 et de l'insuline ont été évalués par RT-qPCR tout au long de la culture (C et D). Le niveau de c-peptide dans le surnageant a été déterminé par ELISA, les résultats sont exprimés en ng de c-peptide par μg d'ARN total (E) (ND : non déterminé). Les résultats présentés sont représentatifs de 2 expériences.

En revanche, lorsque les cultures de cellules issues des 2 autres donneurs ont été inoculées avec CV-B4 E2, les tapis cellulaires n'ont pas été endommagés. L'activité métabolique des cellules infectées et non infectées, mesurées à l'aide de l'Uptiblué®, a augmenté jusqu'au jour 14 p.i. La formation d'ICA a alors été induite, et l'activité métabolique a diminué (**Figure 7A**). Néanmoins, les cellules étaient vivantes au jour 29 p.i, comme le démontre le test de viabilité au bleu trypan (**Figure 7B**). Des particules virales infectieuses ont été détectées dans le surnageant des cultures infectées jusqu'à 29 jours p.i (fin du suivi). Les valeurs variaient de 10^3 à 10^5 TCID₅₀.ml⁻¹ (**Figure 7C**). Les cellules hébergeaient l'ARN de CV-B4 E2 (**Figure 7D**). Aucune trace d'ARN viral n'a été trouvé dans les cellules

canalaires primaires avant l'infection ou dans les contrôles, et ce tout au long de l'expérimentation (données non présentées). Les ICA, dont la formation est induite au jour 14 p.i, sont plus petits lorsque les cellules sont infectées par CV-B4 E2 que lorsque les cellules ne sont pas infectées (**Figure 7E**). Les ICA infectés et non infectés étaient viables, comme le démontre le test de viabilité au bleu trypan.

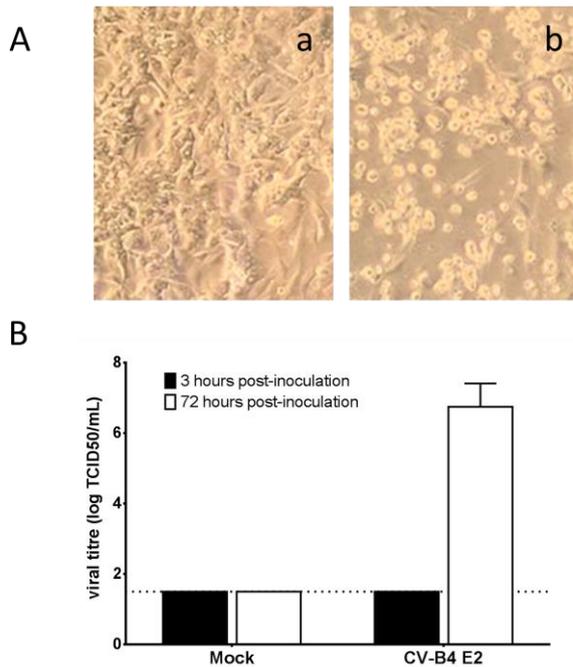


Figure 6 : Cultures de cellules canalaire pancréatiques humaines primaires inoculées avec CV-B4 E2. Des cellules canalaire ont été infectées, ou non, par CV-B4 E2 (A) Le tapis cellulaire a été observé à l'aide d'un microscope inversé 72H post-inoculation (p.i) : (a) mock (b) infectées avec CV-B4 E2 (Grossissement x40). (B) Le titre viral du surnageant de culture collecté 3 et 72H p.i a été déterminé par titrage sur cellules Hep-2. Les résultats sont la moyenne et l'écart-type de 5 expériences indépendantes. La limite de détection du test est représentée par une ligne pointillée (=1.5).

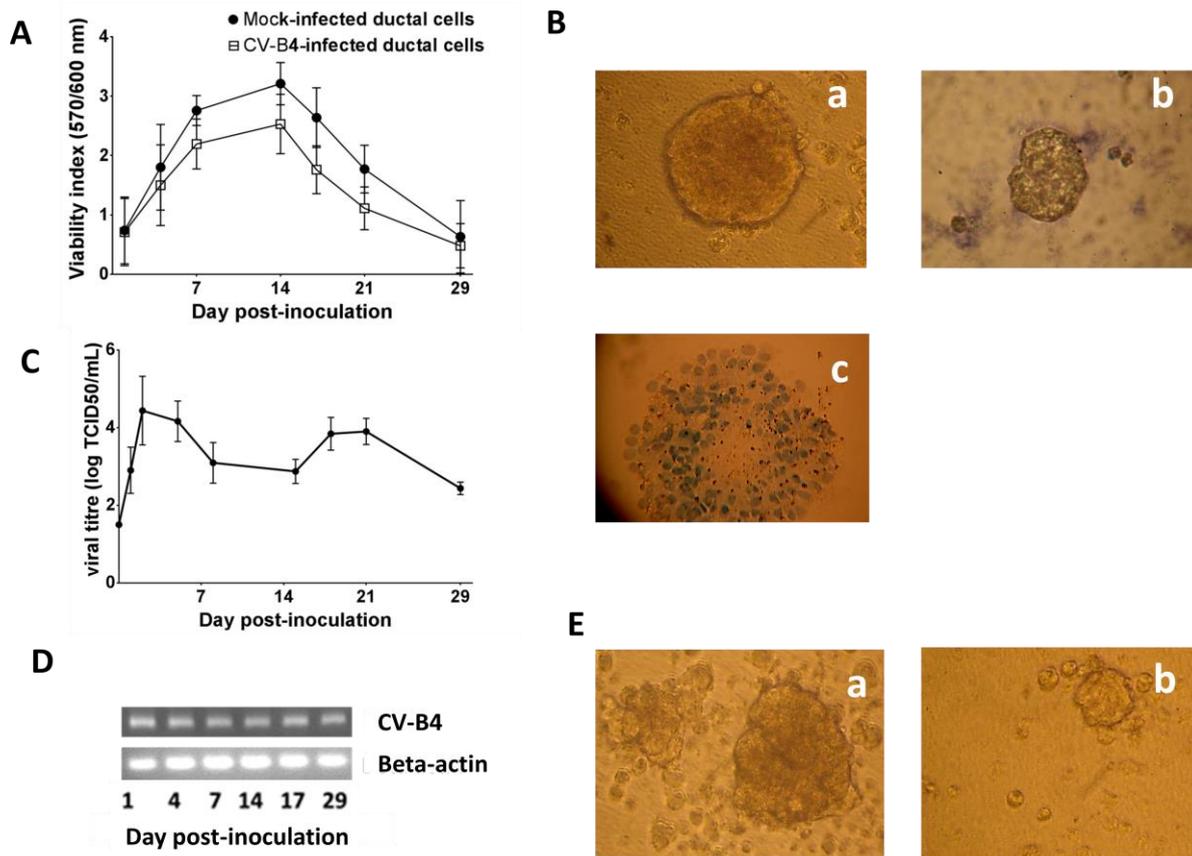


Figure 7 : CV-B4 E2 peut persister dans des cultures de cellules canalaire pancréatiques humaines primaires. Les cultures de cellules canalaire ont été infectées ou non par CV-B4 E2, puis transformées en ICA au jour 14 p.i. (A) L'index de viabilité a été évalué à l'aide de l'Uptiblu®. La moyenne +/- écart-type de 2 expériences indépendantes sont présentés. (B) La viabilité cellulaire a été vérifiée 29 jours p.i en utilisant le test au bleu trypan : (a) culture non infectée (b) culture infectée par CV-B4 E2 (c) culture non infectée maintenue dans le bleu trypan pendant 1H (contrôle positif de mort cellulaire). (C) Le titre viral des surnageants de culture a été mesuré par titrage sur cellules HEp-2. Les résultats sont la moyenne +/- écart-type de 2 expériences indépendantes. (D) Une RT-PCR ciblant l'ARN de CV-B4 E2 (haut) et la β -actine (bas) est effectuée sur des ARN totaux de cellules canalaire prélevés à différents temps d'infection. Les amplicons sont analysés par migration sur gel d'agarose. (E) Dans les cultures différenciées, la morphologie des ICA est évaluée au microscope inversé 24H après l'induction de leur formation : (a) culture non infectée (b) culture infectée. (Grossissement x40). B, D et E : Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

III/ L'infection persistante à CV-B4 E2 peut inhiber la production d'insuline par des cellules canalaire pancréatiques humaines primaires différenciées

Avant la formation des ICA, aucune différence d'expression d'ARNm de l'insuline n'a été observée entre les cellules non infectées et les cellules infectées par CV-B4 E2 (non détruites suite à l'infection). Aucune différence de culture et de différenciation n'a été observée entre les cellules infectées et non infectées. Lorsque la formation d'ICA a été induite, l'expression de l'ARNm de l'insuline était respectivement 2 et 100 fois plus importante dans les cellules non infectées que dans les cellules infectées, aux jours 14 et 29 p.i (**Figure 8A**). Les taux de c-peptide dans les surnageants de culture, mesurés aux jours 14 et 29 p.i par ELISA, et normalisés par la quantité totale d'ARN extrait des cellules, étaient plus bas dans les cultures infectées que dans les cultures contrôles, en concordance avec ce qui est observé pour l'ARNm de l'insuline (**Figure 8B**).

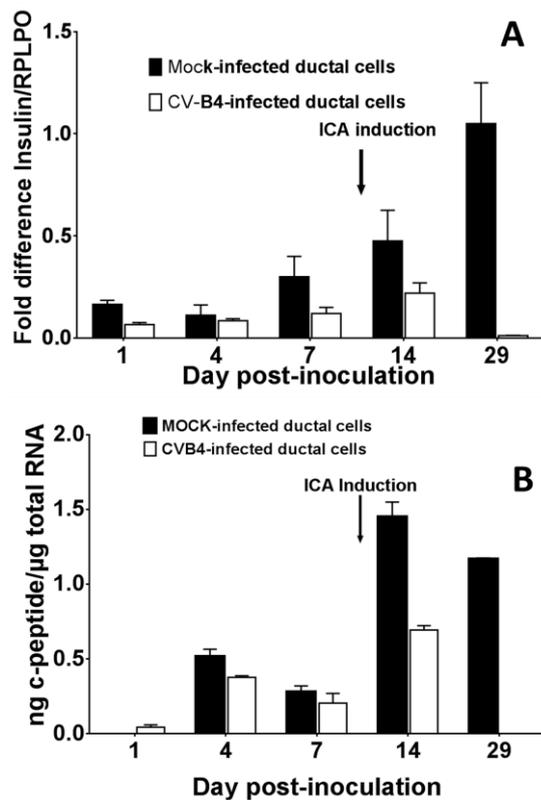


Figure 8 : L'infection persistante à CV-B4 E2 peut inhiber la production d'insuline par des cellules canalaire pancréatiques humaines primaires. Les cultures de cellules canalaire ont été infectées ou non par CV-B4 E2, puis différenciées au jour 14 p.i. (A) L'expression de l'ARNm de l'insuline a été mesurée par RT-qPCR, et normalisée avec l'expression du gène RLPO. (B) Les taux de c-peptide du surnageant des cultures ont été évalués par ELISA, et normalisés par la quantité totale d'ARN extrait des cellules. Les résultats sont la moyenne +/- écart-type de deux expériences indépendantes.

Synthèse

CV-B4 E2 est capable de persister dans des cellules pancréatiques. Les cellules ne sont pas détruites, l'infection persistante n'est pas sans conséquences puisque la sécrétion d'insuline est perturbée. Un modèle d'infection persistante en lignée cellulaire permettrait d'explorer davantage l'impact de CV-B4 E2 sur le métabolisme de l'insuline.

Partie II : Infection persistante à CV-B4 de cellules β et conséquences

Nos travaux indiquent que CV-B4 peut infecter de manière persistante des cellules pancréatiques humaines primaires, ainsi que des lignées cellulaires pancréatiques (Sane et al., 2013). La persistance du virus dans les cellules pancréatiques primaires humaines modifie l'expression et la sécrétion de l'insuline. Pour étudier l'effet d'une infection persistante à CVB4 de cellules β sur la sécrétion d'insuline nous avons fait appel à un modèle de lignée cellulaire. Dans ce travail, la persistance de CV-B4 dans une lignée de cellules β de rat (lignée INS1), et les conséquences de l'infection, notamment sur la sécrétion d'insuline, sont étudiées.

I/ CV-B4 E2 infecte de manière persistante des cellules β pancréatiques

Des cellules β ont été infectées par CVB4E2 avec une MOI de 0.001 (**Figure 9A**). Après 72H d'incubation, une lyse cellulaire massive est observée (**Figure 9B**). Cependant la culture se poursuit. La croissance cellulaire est ralentie, et une confluence inférieure à 1% est observée à J15 p.i (**Figure 9C**). La croissance cellulaire est plus rapide ensuite, et les cellules s'organisent en amas (**Figure 9D**). Les cultures infectées présentent une viabilité similaire à celle des témoins non infectés, comme le montre le test de viabilité à l'uptiblue (**Figure 9E**).

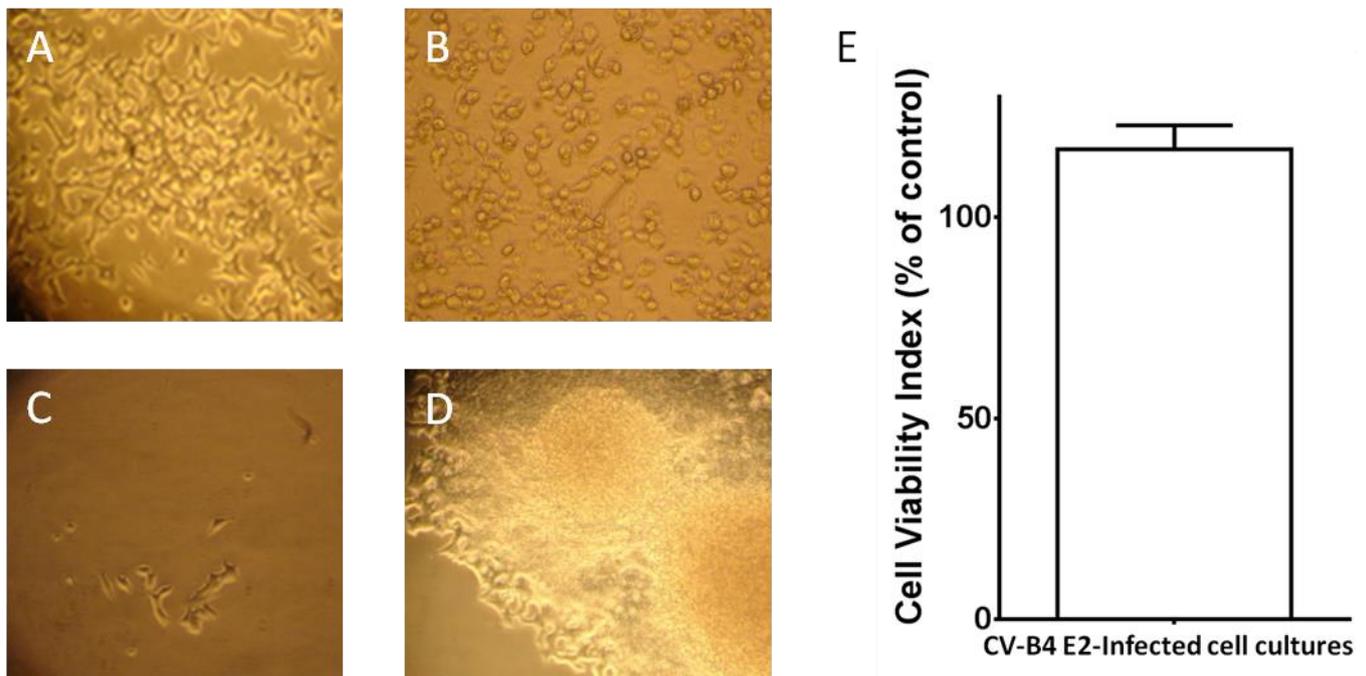


Figure 9 : Infection de cellules β pancréatiques par CV-B4 E2. Des cellules β pancréatiques de rat (lignée INS1) (A) ont été infectées par CV-B4 E2 avec une MOI = 0.001. (B) Un ECP est observable 72H p.i, suivi par la lyse de la plupart des cellules. (C) Seules quelques cellules ont survécu à la phase lytique de l'infection. (D) La culture est poursuivie, et les cellules se sont organisées en amas. Les cellules sont observées au microscope photonique inversé (grossissement x100). (E) La viabilité des cellules est étudiée à l'aide du test à l'Uptiblué®, les résultats sont exprimés en % par rapport aux cellules non infectées (pour lesquelles l'index de viabilité est 100%). Les valeurs correspondent aux moyennes \pm écart type de 10 expériences indépendantes.

Des particules virales infectieuses sont détectées dans le surnageant des cultures infectées par CV-B4 E2. Le titre infectieux a été suivi pendant 230 jours (**Figure 10A**). Le titre en particules virales infectieuses varie au cours de la culture, il atteint 10^8 TCID₅₀.mL⁻¹ pendant les premiers jours de l'infection, les valeurs les plus faibles sont $10^{3.5}$ TCID₅₀.ml⁻¹. L'ARN viral intracellulaire est détecté par RT-PCR dans les cellules infectées (**Figure 10B**). La protéine de capsid VP1 est retrouvée par immunofluorescence dans 1% des cellules des cultures infectées à partir de J45 p.i (Figure 10C).

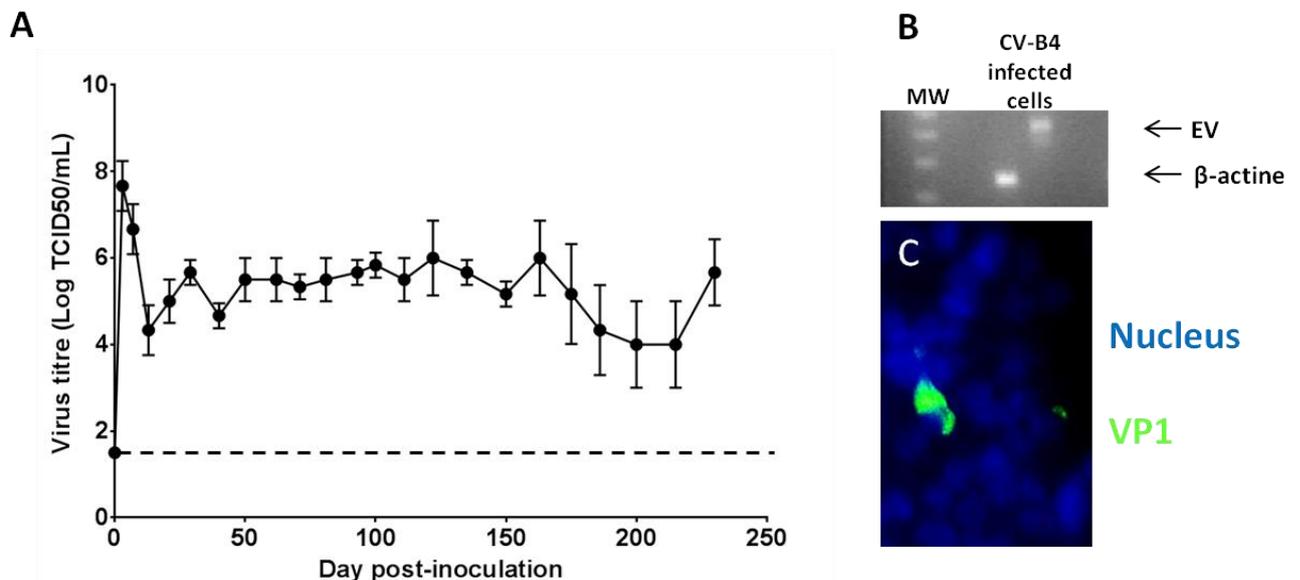


Figure 10 :Persistence de CV-B4 E2 dans des cultures de cellules β pancréatiques. Des cultures de cellules β pancréatiques (lignée INS1) infectées par CV-B4 E2 ont été suivies au cours du temps. Le surnageant de culture et des cellules ont été prélevés. (A) Des particules virales infectieuses ont été détectées par titrage dans le surnageant de culture tout au long du suivi. La limite de détection du titre infectieux (1,5) est indiquée par la ligne pointillée. Les valeurs sont la moyenne \pm écart type de 3 expériences indépendantes. (B) L'ARN entéroviral intracellulaire a été détecté par RT-PCR suivie d'une migration électrophorétique en gel d'agarose des produits d'amplification. MW : Marqueur de taille

(DNA Ladder 100bp[®]). Une bande de 435 pb (EV) correspond au produit d'amplification de la RT-PCR entérovirale (EV). La β -actine a été utilisée comme contrôle de la présence d'ARN, et correspond à une bande de 182 pb (β -actine). (C) Dans des cellules déposées sur lame, fixées et perméabilisées, la protéine de capsid VP1 a été recherchée à l'aide d'un anticorps monoclonal par immunofluorescence indirecte. Les noyaux sont marqués au Hoechst Dye 33342[®]. Les cellules sont observées au microscope inversé (grossissement x200). Les résultats représentatifs de trois expériences indépendantes sont présentés.

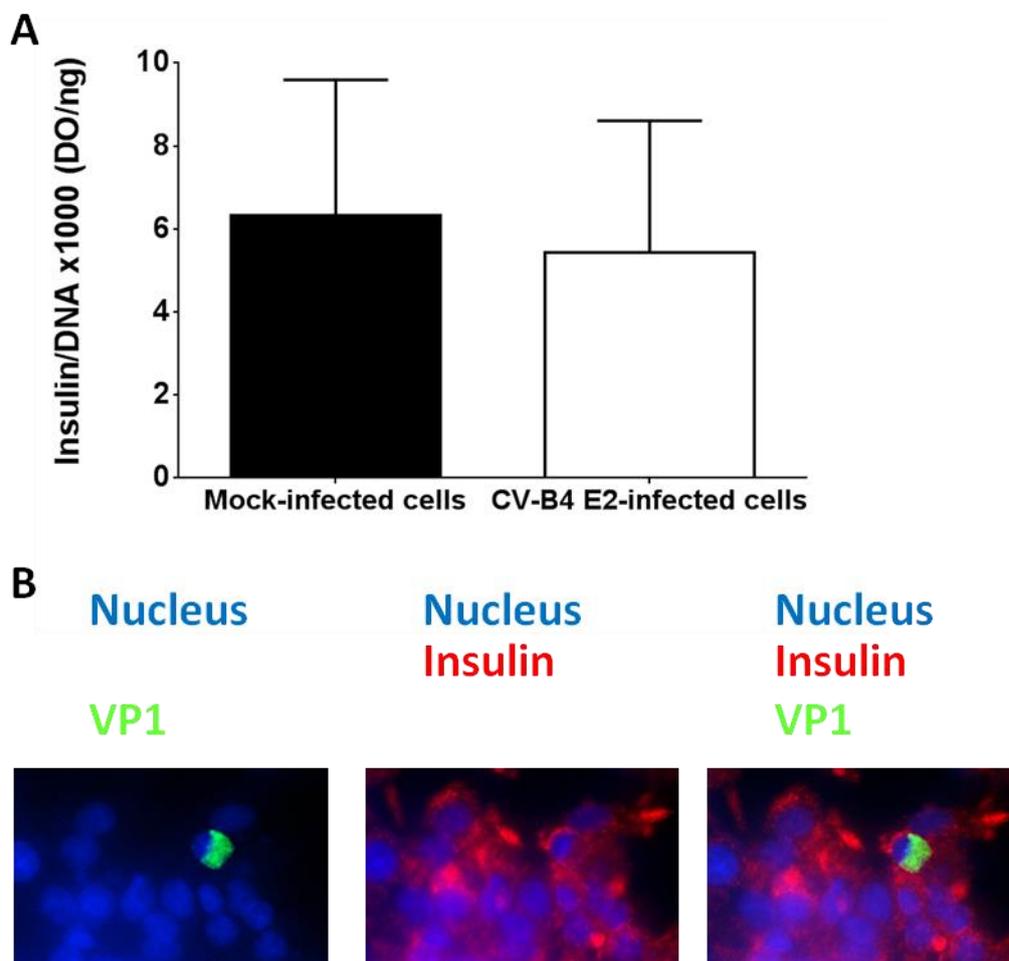


Figure 11 : Les cellules β pancréatiques infectées par CV-B4E2 sécrètent de l'insuline. Des cultures de cellules β pancréatiques (lignée INS1) infectées par CV-B4 E2 ou non infectées ont été maintenues en culture pendant 90 jours. (A) Les cellules ont été cultivées pendant 2 heures dans du milieu RPMI puis le surnageant et les cellules ont été prélevés. La présence d'insuline dans les surnageants de cultures de cellules infectées ou non infectées (mock) a été recherchée à l'aide d'un test ELISA. La quantité d'insuline présente dans les surnageants de cultures est normalisée par la quantité totale d'ADN extrait des cellules. Les valeurs sont la moyenne \pm l'écart type de 10 expériences indépendantes. (B) Des cellules infectées depuis 90 jours ont été cultivées sur des lamelles

en verre avant d'être fixées puis perméabilisées. Les cellules ainsi préparées ont été marquées avec un anticorps anti-protéine de capside VP1 (en vert) et avec un anticorps anti-insuline (en rouge) puis avec un anticorps secondaire fluorescent. Les noyaux marqués à l'aide d'un intercalant (Hoechst Dye ®) apparaissent en bleu au microscope à fluorescence. Les résultats représentatifs de trois expériences indépendantes sont présentés (Grossissement x 200).

II/ L'infection persistante à CV-B4 E2 de cellules β pancréatiques provoque des modifications du métabolisme de l'insuline

Les cellules bêta de la lignée INS1 sécrètent l'insuline. Les concentrations d'insuline détectées par ELISA et normalisées par la quantité totale d'ADN extrait des cellules sont similaires dans le surnageant des cultures infectées et non infectées (**Figure 11A**). L'insuline est détectable par immunofluorescence dans les cultures infectées, et notamment dans les cellules positives pour la détection de la protéine virale VP1 (**Figure 11B**).

L'insuline est issue de la maturation de la proinsuline. La proinsuline intracellulaire est clivée en insuline, qui est transportée, par le biais de vésicules, vers le milieu extracellulaire. La proinsuline est néanmoins détectable dans le surnageant en très faible quantité. Un rapport entre les concentrations de proinsuline et d'insuline d'une culture permet d'évaluer l'efficacité de la maturation de la proinsuline en insuline.

Les concentrations de proinsuline et d'insuline du surnageant des cultures infectées et non infectées sont mesurées par ELISA et le ratio concentration proinsuline / concentration insuline (PI :I) est calculé. Le ratio PI :I pour les cultures infectées est plus de 2,5 fois supérieur au ratio obtenu pour les cellules non infectées (**Figure 12A**). PC2 est une pro-hormone convertase, responsable du premier clivage de la proinsuline lors de sa maturation en insuline. L'expression de l'ARNm de l'enzyme PCSK2, gène codant pour PC2, a été étudiée par RT-qPCR. L'ARNm de PCSK2 est 2 fois moins exprimé dans les cellules infectées de manière persistante par CV-B4 E2 par rapport aux cellules contrôles ($p=0,0001$)(**Figure 12B**).

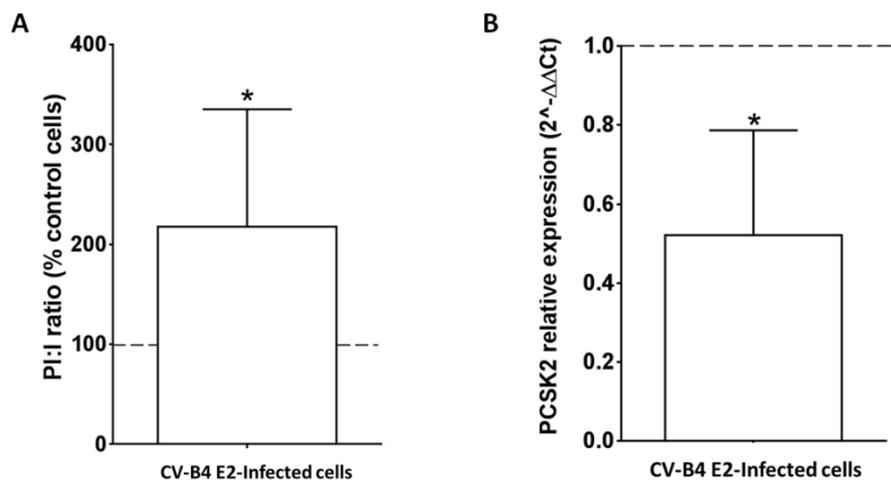


Figure 12 :Profil de la proinsuline, de l'insuline et de la pro-hormone convertase 2 dans des cultures de cellules β pancréatiques infectées de manière persistante par CV-B4 E2. Des cultures de cellules β pancréatiques (lignée INS1) infectées par CV-B4 E2 de manière persistante, ou non infectées, ont été cultivées 2H dans du milieu RPMI, puis le surnageant a été prélevé. Les cellules ont ensuite été lysées pour en extraire l'ARN total. (A) Les concentrations de proinsuline et d'insuline dans les surnageants de cultures infectées et non infectées ont été évaluées par ELISA. Les rapports des concentrations de proinsuline (PI) et d'insuline (I) sont calculés. Les résultats sont exprimés en % du rapport PI:I comparé au rapport PI:I obtenu avec les cultures non infectées (control cells). La valeur du rapport PI:I des cellules non infectées (100%) est représentée par une ligne pointillée. Les valeurs sont la moyenne \pm écart type de 10 expériences indépendantes, * : $p < 0,05$. (B) L'ARNm de la pro-hormone convertase 2 (PCSK2) a été quantifié par RT-qPCR. La normalisation a été effectuée avec l'ARNm de la β -actine. L'expression est calculée par rapport à l'expression moyenne dans les cultures non infectées par la formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La valeur de l'expression de PCSK2 dans les cellules non infectées est représentée par une ligne pointillée. Les valeurs sont la moyenne \pm écart type de 3 expériences indépendantes comprenant 4 à 6 réplicats chacune, * : $p < 0,0005$

III/ L'infection persistante à CV-B4 E2 de cellules β pancréatiques modifie l'expression de protéines cellulaires pancréatiques

Des cellules bêta infectées et non infectées ont été lysées avec un tampon contenant 1% de SDS. Les protéines du lysat cellulaire sont analysées par spectrométrie de masse, selon la méthode *Shotgun*. La présence des protéines cellulaires a été évaluée par leur score SEQUEST. Près de 1700 protéines différentes ont été détectées, dont près de 500 avec un score modifié dans les cellules infectées de

manière persistante. Le score d'identification a été considéré comme modifié lorsqu'il était au moins 1.5 fois plus important ou plus faible que le score obtenu dans les contrôles. La variation du score SEQUEST de 47 protéines était significative dans les cellules infectées de manière persistante par CV-B4 E2 par rapport aux cellules contrôles (**Tableau 3**). Une diminution du score était observée pour 45 protéines avec des degrés de significativité statistique par rapport aux contrôles allant de $p < 0.0005$ pour 3 d'entre elles à $p < 0.005$ pour 7 autres et $p < 0.05$ pour les 35 restantes. Pour 2 autres protéines, le score était significativement augmenté lors de l'infection ($p < 0.05$). Le score de 7 protéines était nul dans les cultures infectées. Par ailleurs une augmentation du score était observée pour 2 protéines dans les cultures infectées : la protéine FAM234A ($p=0.02$), et l'isoforme 2 de la protéine HNRNP A3 ($p=0.02$). L'insuline et la pro-hormone convertase PCSK2 n'étaient pas détectable avec notre méthode de spectrométrie de masse dans les cultures de cellules contrôles et de cellules infectées.

Accession	Protein	Infected cells Score	Controls Score	Score Difference	p-value
P21807	<u>Peripherin</u>	0,00 ± 0,00	12,56 ± 4,10	-12,56	***
Q07266-2	Isoform E1 of Drebrin	6,29 ± 3,00	17,56 ± 2,90	-11,27	***
Q4QQS7	Protein Umps	0,49 ± 0,99	5,40 ± 1,14	-4,91	***
P34926	Microtubule-associated protein 1A	2,00 ± 1,37	14,30 ± 5,17	-12,3	**
Q5XIM9	T-complex protein 1 subunit beta	7,86 ± 3,07	15,90 ± 2,48	-8,04	**
P23514	Coatomer subunit beta	1,05 ± 2,10	5,01 ± 1,13	-3,96	**
D4A2G9	<u>Protein Ranbp1</u>	0,00 ± 0,00	3,60 ± 1,79	-3,6	**
G3V7N5	<u>Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial</u>	0,00 ± 0,00	3,38 ± 1,66	-3,38	**
D3ZMY7	Protein Nt5c2	0,43 ± 0,87	3,75 ± 1,12	-3,32	**
F1LMC7	Septin-7	0,44 ± 0,87	2,60 ± 1,37	-2,16	**
A0A0G2K1J5	Plectin	4,04 ± 2,38	21,11 ± 13,47	-17,07	*
Q6URK4	<u>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</u>	0,00 ± 0,00	16,28 ± 13,66	-16,28	*
P12785	Fatty acid synthase	6,78 ± 3,89	22,06 ± 8,44	-15,28	*
A0A0G2JU82	Microtubule-actin cross-linking factor 1	7,59 ± 5,23	22,14 ± 9,29	-14,55	*
Q05982	Nucleoside diphosphate kinase A	6,26 ± 8,23	20,65 ± 6,46	-14,39	*
Q6URK4-2	<u>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 2</u>	18,03 ± 4,53	4,98 ± 8,08	+13,05	*
A0A0G2K013	Alpha-actinin-4	9,04 ± 1,59	21,08 ± 7,58	-12,04	*
P06687	<u>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3</u>	0,00 ± 0,00	11,90 ± 7,78	-11,9	*
D4AD15	<u>Protein Eif4g1</u>	4,66 ± 2,13	16,16 ± 6,89	-11,5	*
A0A0G2K0Q7	Protein Mylk	3,17 ± 2,13	11,74 ± 4,47	-8,57	*
O35314	Secretogranin-1	5,04 ± 1,57	13,22 ± 4,74	-8,18	*
Q62667	Major vault protein	6,15 ± 2,75	14,06 ± 4,71	-7,91	*
D4AC23	Protein Cct7	6,14 ± 1,77	13,98 ± 4,59	-7,84	*
P04692-5	Tropomyosin alpha-1 chain isoform 5	1,62 ± 3,23	8,57 ± 5,17	-6,95	*
Q3MIE4	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	2,34 ± 2,20	9,00 ± 3,48	-6,66	*
D3ZRM9	<u>Uncharacterized protein</u>	0,00 ± 0,00	6,54 ± 3,76	-6,54	*
D3ZRM9	<u>Uncharacterized protein</u>	0,00 ± 0,00	6,54 ± 3,76	-6,54	*
Q62950	Dihydropyrimidinase-related protein 1	2,41 ± 3,70	8,67 ± 4,13	-6,26	*
F1MAA1	Ubiquitin-specific peptidase 47	2,26 ± 2,61	8,50 ± 4,06	-6,24	*
O35303-6	Dynamamin-1-like protein isoform 6	1,91 ± 3,83	7,53 ± 2,90	-5,62	*
P41562	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	2,57 ± 3,14	8,07 ± 2,98	-5,5	*
D4A0C3	Protein Hid1	1,38 ± 1,78	6,44 ± 2,39	-5,06	*
A0A0G2JZ60	Protein Fsd1l	3,86 ± 3,10	8,89 ± 2,01	-5,03	*
A0A0G2JUN7	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	2,77 ± 1,97	7,38 ± 2,33	-4,61	*
D3ZVQ0	Protein LOC100911959	2,72 ± 2,66	7,14 ± 1,73	-4,42	*
O70593	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	1,03 ± 1,21	5,43 ± 2,75	-4,4	*
P50475	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,44 ± 0,88	4,76 ± 2,41	-4,32	*
P27008	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	1,90 ± 2,77	6,15 ± 2,62	-4,25	*
B2RYI2	Signal recognition particle subunit SRP68	2,03 ± 1,60	6,04 ± 1,87	-4,01	*
Q05096-3	Unconventional myosin-Ib isoform 3	1,96 ± 2,70	5,89 ± 1,41	-3,93	*
O88321	Antisecretory factor	1,47 ± 1,86	5,33 ± 2,30	-3,86	*
B2GV74	Kinesin light chain 2	1,08 ± 2,16	4,89 ± 2,36	-3,81	*
Q9Z1W6-4	Protein LYRIC isoform 4	0,54 ± 1,08	3,58 ± 2,25	-3,04	*
A0A0H2UHW4	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	0,42 ± 0,85	3,29 ± 2,02	-2,87	*
E9PT23	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 10	0,46 ± 0,93	3,00 ± 1,92	-2,54	*
D3Z8U5	Metalloendopeptidase	0,87 ± 1,73	3,10 ± 1,25	-2,23	*
Q5M7W6	Protein FAM234A	5,24 ± 0,98	1,88 ± 2,18	+3,36	*

Tableau 3 : Analyse par spectrométrie de masse des protéines de cellules β infectées par CV-B4

Des cellules INS1 infectées ou non par CV-B4 E2 sont lysées dans un tampon contenant du SDS pour en extraire les protéines. Les protéines sont analysées en spectrométrie de masse SHOTGUN. Les résultats sont exprimés en score d'identification SEQUEST des protéines. La différence de score entre les cellules infectées et les contrôles a été calculée. Les protéines de cellules infectées pour lesquelles la

valeur du score d'identification est 0 sont encadrées. Les résultats sont la moyenne \pm écart-type de 6 réplicats. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,005$, *** : $p < 0,0005$.

IV L'infection persistante à CV-B4 E2 de cellules β pancréatiques provoque des modifications de méthylation de l'ADN.

L'ADN de cellules β , infectées ou non, a été extrait. Le taux de cytosines méthylées a été mesuré à l'aide d'une méthode ELISA. Le taux de cytosines méthylées de l'ADN de cellules infectées de manière persistante est significativement plus élevé que celui de l'ADN de cellules contrôles (**Figure 13**). Dans des cellules β infectées par CV-B4 E2, et dont l'ADN est prélevé 2 jours après infection, le taux de cytosines méthylées est comparable à celui observé dans des cellules non infectées (données non présentées).

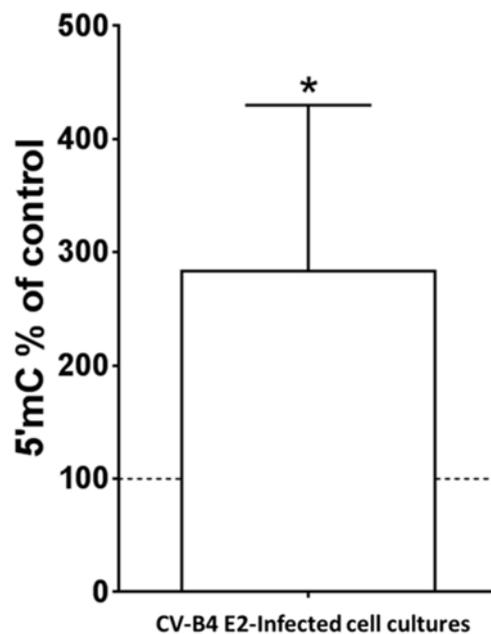


Figure 13 : L'ADN des cellules β pancréatiques infectées de manière persistante par CV-B4E2 est hyperméthylé. Des cultures de cellules β pancréatiques (lignée INS1) infectées par CV-B4 E2 de manière persistante, ou non infectées, ont été lysées pour en extraire l'ADN total. Le taux de cytosines méthylées (5'mC) de l'ADN de cellules infectées ou non a été mesuré à l'aide d'un test ELISA. Les résultats sont exprimés en % du taux de 5'mC de l'ADN des cellules non infectées (Mock). La valeur de méthylation des cellules mock est représentée par une ligne pointillée. Les valeurs sont la moyenne \pm écart type de 4 expériences indépendantes, * : $p < 0,05$.

Synthèse

CV-B4 E2 est capable de provoquer une infection persistante de cellules β pancréatiques. Cette infection productive et durable a pour conséquence une anomalie de la maturation de l'insuline. L'hyperméthylation de l'ADN des cellules infectées de manière persistante, ainsi que les modifications du profil des protéines cellulaires en spectrométrie de masse, mettent en évidence l'impact de l'infection persistante à CV-B4 E2 sur les cellules β . Ces observations supportent l'hypothèse que l'expression de facteurs endogènes potentiellement impliqués dans la pathogénèse du DT1 puisse être modulée lors de l'infection persistante de cellules β par CVB4E2.

Partie III : Expression de HERV-W Env dans des cellules infectées par CV-B4

L'infection par CV-B4 module l'expression de gènes cellulaires qui peuvent être impliqués dans la pathogénèse du DT1. Parmi les gènes candidats à une activation par CV-B4, une séquence d'origine rétrovirale attire particulièrement l'attention. La protéine d'enveloppe du rétrovirus HERV-W est retrouvée dans le sérum, les PBMC et le pancréas de patients diabétiques (Levet et al., 2017). Dans la sclérose en plaques l'expression de HERV-W Env est activée par HHV-6 (Charvet et al., 2018). Dans le contexte de la pathogénèse du DT1 l'hypothèse de l'activation de l'expression de HERV-W Env au cours l'infection à CV-B4 mérite d'être explorée.

I/ Expression du gène HERV-W Env dans des cultures de macrophages humains primaires infectées par CV-B4

Des CMN de donneurs sains sont isolées d'une poche de concentré leucocytaire comme décrit dans le chapitre « matériel et méthodes ». Les monocytes sont sélectionnés par adhérence, et cultivés en présence de M-CSF pour être différenciés en macrophages (**Figure 14A**). Les macrophages sont ensuite infectés par CV-B4 E2 ou CV-B4 JVB (MOI = 1 ou 10), puis incubés pendant 6h, 16h et 48h (**Figure 14B**). La viabilité cellulaire est mesurée (test à l'orange®), et aucune différence notable n'est observée entre les cellules infectées et non infectées (**Figure 14C**). Les cellules infectées produisent néanmoins des particules virales infectieuses dans le surnageant, titre infectieux de l'ordre de 10^3 TCID₅₀.mL⁻¹ pour les deux souches de virus (**Figure 14D**).

Des cultures de macrophages ont été obtenues à partir de cellules issues de 14 donneurs différents. L'expression de l'ARNm de HERV-W Env a été mesurée par RT-qPCR et ramené à la quantité d'ARNm de la β -actine. Un facteur d'expression d'HERV-W Env par rapport aux cultures contrôles est calculé. Un facteur d'expression > 2 dans les cellules infectées est la valeur pour laquelle il est considéré que l'expression d'HERV-W Env est accrue. Un facteur d'expression de HERV-W Env >2 lors de l'infection à CV-B4 a été obtenu dans les cultures de 6 donneurs sur 14. La surexpression de HERV-W Env est obtenue au bout de 16h ou 48h dans les cultures de macrophages, quand les cellules sont infectées par CV-B4 E2 ou CV-B4 JVB avec une MOI=1 ou MOI=10 (**Figure 15A**). La moyenne des facteurs d'expression d'HERV-W Env était 2,7 lorsque les macrophages étaient infectés par CV-B4 E2 à une MOI de 1 et cultivés pendant 48h (**Figure 15B**). En ne considérant que les cultures infectées dans lesquelles les facteurs d'expression d'HERV-W Env étaient > 2 la valeur moyenne était 4.41 ± 1.11 alors que dans les cultures infectées dans lesquelles les facteurs d'expression d'HERV-W Env étaient <2 la valeur moyenne était 1.17 ± 0.09 ($p = 0.0054$) (**Figure 15C**).

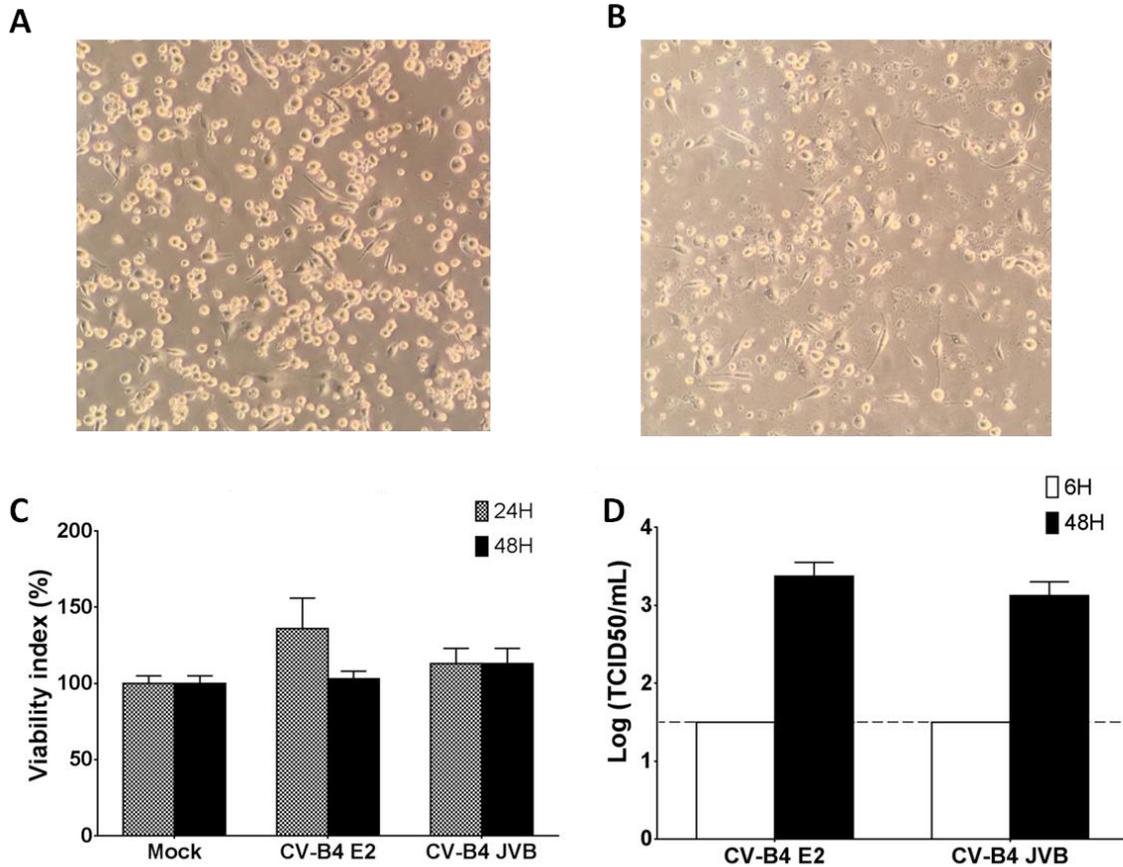


Figure 14 : Culture et infection de macrophages humains primaires. Des monocytes ont été isolés de CMN obtenues de 14 donneurs. Ils ont été sélectionnés par adhésion dans des plaques de culture. Les monocytes ainsi obtenus ont été traités avec du M-CSF pour être différenciés en macrophages. Les cultures de macrophages (A) ont été infectées par CV-B4 E2 ou CV-B4 JVB avec MOI = 1 ou MOI = 10. Les tapis de cellules sont observés au microscope inversé (grossissement x100) après 48H d'incubation, les résultats sont représentatifs de 14 expériences indépendantes (B). La viabilité cellulaire a été mesurée grâce au test à l'Uptiblue. Les valeurs de viabilité sont la moyenne \pm écart-type de 14 expériences indépendantes (C). Le titre viral des surnageants de cultures prélevés à 6 et 48 heures p.i ont été déterminés par titrage en point final sur des cellules HEp-2. Les résultats exprimés en TCID₅₀.mL⁻¹ sont la moyenne \pm écart-type de 14 expériences indépendantes (D).

La protéine HERV-W Env a été recherchée dans les macrophages et dans les surnageants de culture par immunoblot. La protéine n'a cependant pas été détectée (données non montrées).

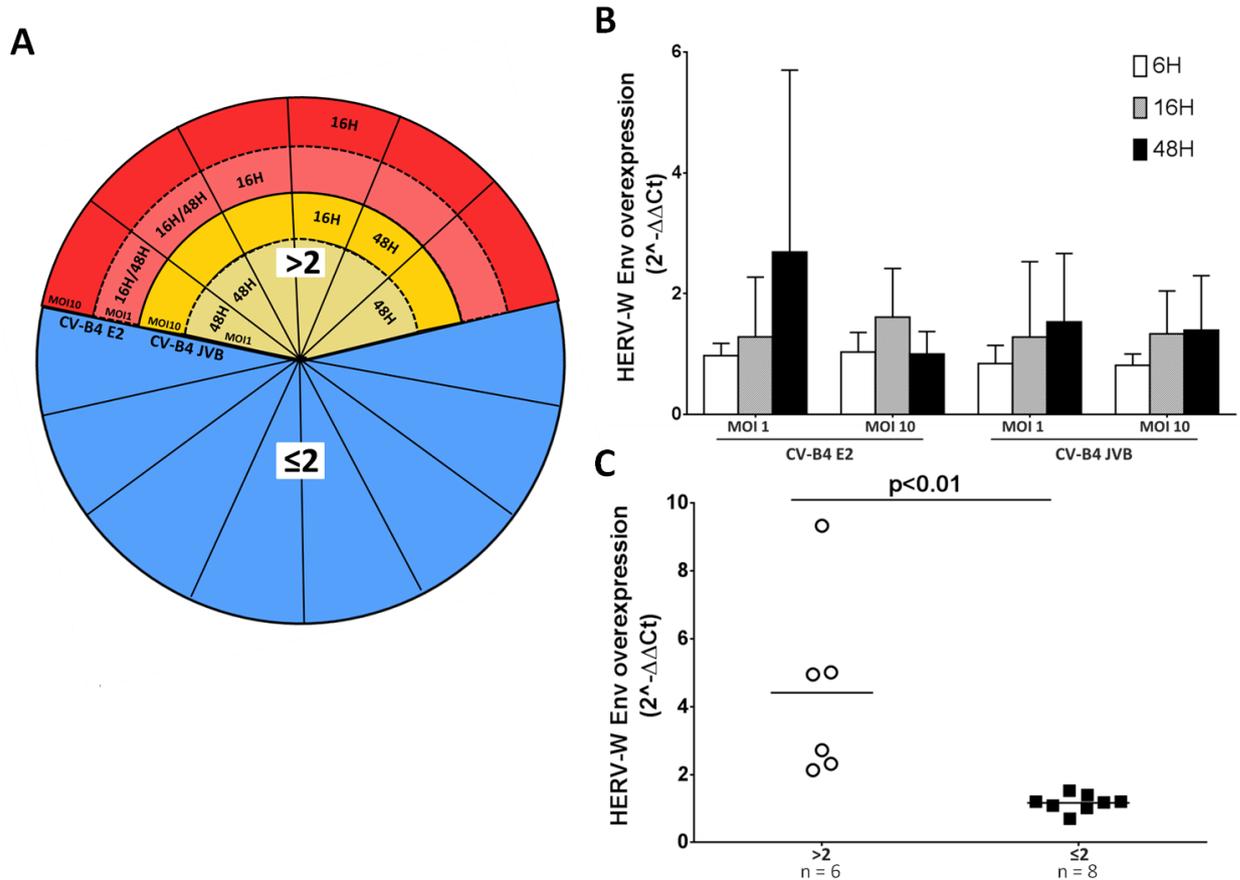


Figure 15 : Expression de l'ARNm d'HERV-W Env dans des cultures de macrophages primaires humains infectés par CV-B4. Des cultures de macrophages provenant de 14 donneurs ont été infectées par CV-B4 E2 ou CV-B4 JVB avec MOI = 1 ou MOI = 10. L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide du tri-reagent pour mesurer l'expression de HERV-W dans les cellules par RT-qPCR. L'expression relative par rapport aux cellules non infectées est calculée. A) Représentation individuelle de l'expression d'HERV-W Env suite à l'infection des cultures par CVB4. Les résultats sont regroupés selon que l'expression relative d'HERV-Env par rapport aux contrôles est: >2 $n=6$ (partie supérieure) ou ≤ 2 $n=8$ (partie inférieure). Les cultures dans lesquelles l'expression d'HERV-W Env est retrouvée accrue (index >2) sont indiquées par la durée d'incubation (16 h ou 48h). L'activation avec CVB4 E2 à MOI 1 et 10 est représentée par les éléments périphériques, l'activation avec CVB4 JVB à MOI 1 et 10 est représentée par les éléments les plus internes. B) Facteur d'expression relative moyenne de HERV-W Env dans les macrophages humains primaires récupérés au bout de 6h, 16h et 48h de culture post inoculation avec le virus. Les résultats sont la moyenne \pm l'écart type de 14 expériences indépendantes. C) Représentation individuelle des facteurs d'expression de HERV-W Env chez des sujets regroupés selon que l'expression d'HERV-Env dans leurs macrophages infectés par CV-B4 est >2 ou ≤ 2 .

II/ Expression du gène HERV-W Env dans des cultures de cellules pancréatiques humaines primaires infectées par CV-B4

Des cellules pancréatiques canalaies primaires sont isolées du pancréas de 5 donneurs en état de mort cérébrale. Les cultures, lorsqu'elles sont confluentes (**Figure 16A**) sont infectées par CV-B4 E2. Un ECP est observé 48H p.i (**Figure 16B**), accompagné d'une diminution de la viabilité mesurée par l'uptiblue® (**Figure 16C**). Des particules virales infectieuses sont retrouvées dans la surnageant, à des concentrations proches de 10^5 TCID₅₀.mL⁻¹ (**Figure 16D**). L'expression de l'ARNm de HERV-W Env est recherchée dans les cultures de cellules pancréatiques par RT-qPCR.

Une expression relative de l'ARNm de HERV-W Env > 2 a été retrouvée dans les cultures de cellules pancréatiques de 4 donneurs en état de mort cérébrale sur 5 étudiées. Dans les cellules provenant des donneurs 2, 3, 4 et 5, les facteurs d'expression maximum du gène HERV-W Env étaient 2.63, 14.90, 2 et 2.36 respectivement. Dans les cellules provenant du donneur 1, le facteur d'expression maximal était 0.89 (**Figure 17**).

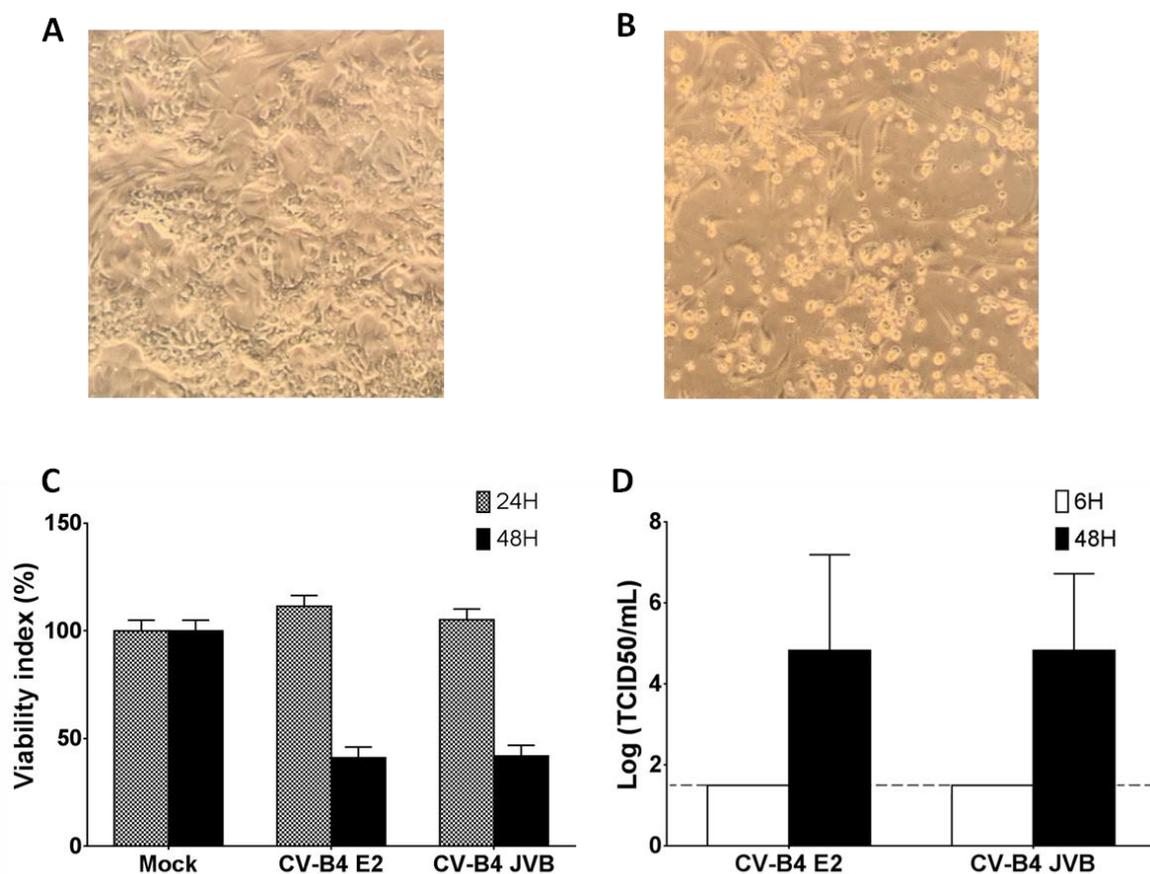


Figure 16: Culture et infection par CV-B4 de cellules pancréatiques humaines primaires. Des cultures de cellules pancréatiques humaines primaires ont été mises en œuvre à partir de pancréas de 5 donneurs en état de mort cérébrale (A). Les cultures ont été infectées par CV-B4 E2 ou CV-B4 JVB à

une MOI de 0,01, 0,1 ou de 1. Les tapis de cellules ont été observés au microscope inversé (grossissement x100) après 48H d'incubation (B). La viabilité a été analysée à l'aide de l'Uptiblue[®]. Les valeurs d'absorbance ont été calculées par rapport à celles des cellules non-infectées (mock) (100%) (C). Les particules virales infectieuses ont été quantifiées dans la surnageant par titrage de virus. Les résultats sont la moyenne \pm l'écart-type de 5 expériences indépendantes (D).

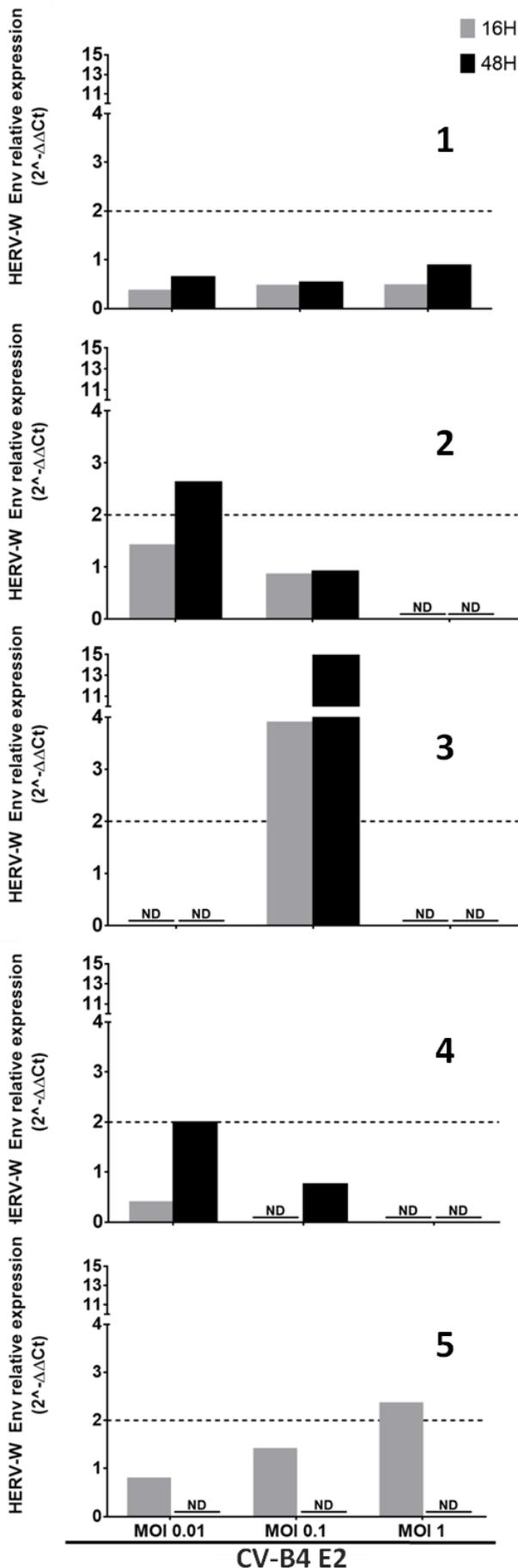


Figure 17 : Expression de l'ARNm d'HERV-W Env dans des cultures de cellules pancréatiques primaires humaines infectées par CV-B4 E2. Des cultures de cellules pancréatiques humaines primaires ont été mises en œuvre à partir de pancréas de 5 donneurs en état de mort cérébrale. Les cultures ont été infectées par CV-B4 E2 à une MOI de 0,01, 0,1 ou de 1. L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide de tri-reagent pour mesurer l'expression de l'ARNm d'HERV-W dans les cellules par RT-qPCR. Le facteur d'expression relative par rapport aux cellules non infectées est calculé. Les facteurs d'expression du gène HERV-W Env sont représentés pour chaque donneur (1 à 5). La ligne pointillée représente la valeur seuil 2.

La protéine HERV-W Env a été recherchée dans les cellules canalaire infectées par CV-B4 E2. Dans les cellules infectées avec une MOI de 0.1, la protéine Env était 4 fois plus abondante que dans les contrôles, que ce soit à 16 ou 48H p.i. Lorsque les cellules étaient infectées avec une MOI de 1, l'expression de la protéine Env était respectivement 25 et 20 fois supérieure à celle des contrôles après 16 ou 48H d'infection (**Figure 18**).

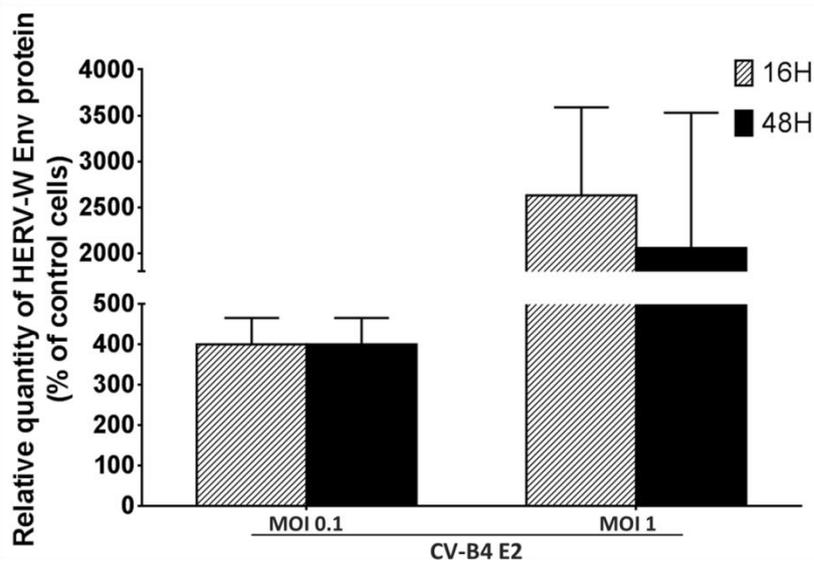


Figure 18 : Expression de la protéine HERV-W Env dans des cultures de cellules pancréatiques primaires humaines infectées par CV-B4 E2. Des cultures de cellules pancréatiques humaines primaires ont été mises en œuvre à partir de pancréas de 2 donneurs en état de mort cérébrale. Les cultures ont été infectées par CV-B4 E2 avec une MOI de 0,1 ou 1. Les protéines intracellulaires ont été extraites. La protéine Env a été recherchée par immunoblot à l'aide de l'automate WES®. La quantité de protéines est exprimée en fonction de celle détectée dans les cellules non infectées. Les résultats sont la moyenne \pm l'écart-type de 2 expériences indépendantes.

DISCUSSION

Partie I: Infection persistante à CV-B4 de cellules canalaire pancreatiques humaines primaires

Dans notre étude, des cellules canalaire pancreatiques humaines primaires ont été cultivées pendant 7 semaines. Dans ce système, la formation d'ICA peut être induite, et les cellules sont différenciées en cellules productrices d'insuline. Les cultures sont traitées comme décrit précédemment pour induire la différenciation des cellules Panc-1 (Sane et al., 2013). La méthode est fondée sur celle décrite par Hardikar et al (Hardikar et al., 2003) . Il s'agit d'une procédure simple et commode pour les études *in vitro*, qui induit un stress dans la cellule (traitement avec 0.05% de trypsine, puis culture en milieu sans serum). Dans d'autres travaux, des cellules canalaire humaines primaires ont été différenciées en cellules productrices d'insuline par un traitement avec la protéine BMP7 (*Bone Morphogenetic Protein*), ou par des transfections utilisant des vecteurs viraux pour exprimer des facteurs de transcriptions tels que PDX1, Neurog3 ou Pax6 (Klein et al., 2015 ; Lee et al., 2013). D'autres équipes ont obtenu une différenciation de cellules canalaire pancreatiques humaines primaires caractérisée par la formation d'ICA, de taille croissante de 3 à 9 jours post-induction, avec une sécrétion d'insuline détectée dès 5 jours post-induction (Klein et al., 2015). La différenciation de cellules canalaire pancreatiques humaines primaires dans nos travaux est marquée par la formation rapide d'ICAs observés dès 18H post-induction, immédiatement suivie par une sécrétion d'insuline mise en évidence par la détection de c-peptide dans le surnageant de culture. Du fait de la présence d'insuline dans le milieu de culture des cellules canalaire, le c-peptide, un sous-produit de la sécrétion d'insuline, a été mesuré dans le surnageant de culture. De plus, la synthèse d'insuline par des cellules différenciées a été mise en évidence par l'augmentation d'expression de l'ARNm de l'insuline, comparée aux contrôles non différenciés. Les niveaux de c-peptide dans le surnageant et d'ARNm de l'insuline démontrent que les cellules canalaire pancreatiques peuvent se différencier en cellules productrices d'insuline *in vitro* dans nos expériences.

Des cultures de cellules canalaire pancreatiques humaines primaires ont été inoculées avec CV-B4 E2. Chaque culture inoculée avec le virus a été effectivement infectée comme l'indique le titre viral du surnageant. Dans 5 cas sur 7, l'inoculation de CV-B4 E2 aux cultures a provoqué d'importants dégâts au tapis cellulaire à 3 jours p.i, alors qu'aucune altération n'était observée dans les cultures non infectées. Cependant, l'impact de CV-B4 E2 dans les cultures issues des deux autres donneurs n'était pas aussi destructeur. En effet, il n'y a pas eu de dégâts induits par le virus dans ces cultures, ce qui concorde avec les précédentes observations de notre équipe (Sane et al., 2013). Nos résultats

passés et actuels indiquent qu'il y a une variation inter-individuelle de l'impact de CV-B4 E2 inoculé aux cultures de cellules canalaire pancréatiques humaines primaires. Cette observation fait écho à des travaux d'autres équipes ayant montré que le degré de destruction (noté de 0 à 4) des îlots de pancréas par l'infection à CV-B4 était variable selon les individus (Hodik et al., 2016).

Dans nos travaux antérieurs, des cultures de cellules canalaire pancréatiques humaines primaires ont été maintenues en culture pendant une semaine, alors qu'elles ont été cultivées pour une période plus longue (jusqu'à 7 semaines) dans la présente étude (Sane et al., 2013). CV-B4 E2 a persisté dans ces cultures jusqu'à la fin du suivi (4 semaines p.i). Dans les cultures non altérées par l'infection à CV-B4 E2, l'impact du virus sur la différenciation et la production d'insuline a été étudié. Il est notable qu'une différenciation incomplète se traduisant par des ICAs plus petits et moins nombreux a été observée dans ces cultures. De plus, dans les cultures infectées de manière persistante par CV-B4 E2, le niveau d'expression de l'ARNm de l'insuline et le niveau de c-peptide du surnageant étaient plus bas que dans les contrôles.

Le nombre de donneurs était limité, mais les résultats ont indiqué que CV-B4 peut soit endommager les cellules canalaire pancréatiques humaines primaires, soit persister dans ces cellules, avec pour conséquence une différenciation altérée en cellules sécrétrices d'insuline. Des études incluant des cohortes plus importantes sont nécessaires afin de déterminer quels sont les facteurs de l'hôte responsables des variations inter-individuelles observées concernant l'impact de CV-B4 E2 sur les cultures de cellules pancréatiques. Quelques soient ces facteurs de l'hôte et la nature de l'infection, CV-B4 E2 peut empêcher la différenciation de cellules canalaire pancréatiques en cellules productrices d'insuline, que ce soit par le biais d'une lyse cellulaire ou d'une infection persistante. Le système décrit dans notre étude est un modèle cellulaire unique et novateur pour décrypter les interactions entre CV-B4 E2 et les cellules pancréatiques humaines susceptibles de participer à la pathogénèse du DT1. Des travaux seront orientés dans cette direction dans notre laboratoire.

Partie II : Infection persistante à CV-B4 de cellules β et conséquences

Notre équipe mis en évidence la persistance de CV-B4 dans des ilots pancréatiques humains (Chehadeh et al., 2000) dans des cellules pancréatiques canalaire primaires humaines (Bertin et al., 2019), et dans une lignée de cellule β humaine (1.1B4) résultant d'une fusion avec la lignée Panc-1 (Nekoua et al., 2019). Ce dernier modèle de cellule β ne produit pas d'insuline, l'impact de la persistance du virus sur la production de cette hormone n'a donc pas été étudié. Nous rapportons dans la présente étude l'infection persistante par CV-B4 de cellules β sécrétrices d'insuline.

L'infection de cellules β par CV-B4 dans cette étude se caractérise par la lyse d'une large majorité de cellules lors des premiers jours d'infection, accompagnée d'une production massive de particules virales, ce qui est en faveur d'une infection lytique, caractéristique des infections à entérovirus (Baboonian et al., 1997). Des cellules survivent à cette crise aiguë et se multiplient. Après quelques semaines de culture, la persistance du virus est alors établie, et l'observation des tapis de cellules au microscope inversé ne relève pas d'altérations. Le profil de l'infection à CV-B4 dans notre système de cellules β , comprenant une phase lytique suivie de la persistance du virus avec libération de virions infectieux sans lyse cellulaire est comparable à celui observé antérieurement dans un modèle d'infection à CV-B4 de cellules canalaire pancréatique humaine (lignée Panc-1) et de cellule β (lignée 1.1B4) (Sane et al., 2013 ; Nekoua et al., 2019).

Les valeurs de titre viral des surnageants de cultures infectées prélevés au cours des semaines et des mois du suivi varient de $10^{3.5}$ à $10^{6.5}$ TCID₅₀.mL⁻¹. Tout au long du suivi des cultures le pourcentage de cellules hébergeant la protéine de capsid VP1, détectée par IFI, est faible ($\approx 1\%$). Dans les études antérieures de notre équipe, il avait été montré à l'aide d'une technique de RT-PCR appliquée à une seule cellule, que l'ARN viral était retrouvé dans plus de 50% des cellules pancréatiques canalaire infectées de manière persistante par CVB4, alors que la protéine VP1 n'était présente que dans moins de 5% des cellules (Sane et al., 2013). De ce fait, dans nos expériences, l'hypothèse que la proportion de cellules β infectées par CV-B4 de manière persistante hébergeant l'ARN viral soit plus importante que ne l'indique la présence de la protéine VP1 ne peut être exclue.

L'infection par les echovirus 16 et 30, de cellules β pancréatique et l'impact sur la sécrétion d'insuline ont été rapportés. Dans ce modèle d'infection aiguë, une diminution de la sécrétion d'insuline avait été mise en évidence (Sarmiento et al., 2016). Dans notre système d'infection persistante par CV-B4, la quantité d'insuline sécrétée n'est pas modifiée par l'infection. Cependant, l'insuline est impactée puisque le ratio proinsuline sécrétée sur insuline sécrétée est plus élevé lors

de l'infection, à cause d'une sécrétion de proinsuline plus importante que dans les cellules non infectées.

Nous avons montré que l'ARNm de PCSK2 est sous-exprimé dans les cellules β infectées par CV-B4 de manière persistante. PCSK2 est le gène codant PC2, une pro-hormone convertase qui effectue le clivage de la proinsuline entre les résidus Lys 64 et Arg 65. Ce clivage sépare les chaînes A et C de la proinsuline. La maturation de poursuit lors du transport vésiculaire et abouti à la sécrétion d'insuline et de c-peptide (Smeekens *proc natl acad sci usa* 1992 ; davidson *nature* 1988). L'inhibition de PCSK2 peut perturber la maturation de l'insuline, dont la conséquence est une sécrétion accrue de proinsuline par les cellules β (Cell metab 2017 Wasserfall).

Il a été rapporté que l'exposition des cellules β à l'interféron- α , qui induit un stress du RE, entraîne une inhibition de l'expression des PC2, et perturbe ainsi le métabolisme de l'insuline aboutissant à une sécrétion excessive de proinsuline (Lombardi et al., 2017) Du fait de remaniements chromosomiques, il est admis que les lignées continues ne produisent pas d'IFN α (Denning et al., 1988) cependant, l'ARNm de l'IFN α et la protéine peuvent être détectés dans certaines d'entre elles (Nair et al., 2010 ; Goffard et al., 2013).

Il n'est pas exclu que l'IFN α en très faible quantité ou d'autres médiateurs cellulaires, libérés par les cellules infectées dans notre modèle jouent un rôle dans l'altération de la sécrétion d'insuline que nous avons observé. Néanmoins l'hypothèse d'un impact direct de la réplication du virus dans la cellule et ou de ses constituants, protéines et/ou ARN, sur le métabolisme de l'insuline, mériterait d'être explorée.

Il est intéressant de noter qu'une augmentation de proinsuline sérique a été rapportée chez des patients avec un DT1, et que celle-ci précède la perturbation de l'équilibre glycémique (Endoc pract 2017 Steenkamp ; Cell metab 2017 Wasserfall). Par ailleurs, la proinsuline est un auto-antigène reconnu par les lymphocytes T CD4+ chez les patients avec un DT1 (Diabetes 2017 Cianciaruso ; So et al., 2018 ; Diabetes 2017 Michels et al.). Il a été rapporté que la sécrétion excessive de proinsuline serait due à l'exposition des cellules β à l'interféron α , ou un défaut de maturation de l'insuline (Lombardi et al., 2017). Des travaux complémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'altération du métabolisme de l'insuline observée chez les patients est liée à un effet direct de CV-B4 ou d'autre entérovirus sur les cellules β et/ou à un effet indirect via l'IFN α produit en réponse à l'infection.

La plus faible quantité d'ARNm de PCSK2 dans les cultures infectées de manière persistante par CV-B4 par rapport aux contrôles indique que d'une manière ou d'une autre ce virus à réplication cytoplasmique a un impact sur le noyau des cellules se manifestant notamment par l'inhibition du gène PCSK2. Cette observation rappelle celle déjà rapportée par notre équipe concernant l'inhibition d'expression de PDX1 quand des cellules pancréatiques sont infectées par CV-B4 de manière persistante (Sane et al., 2013). Par ailleurs l'inhibition d'expression de gènes dans des

modèles d'infection aiguë in vitro par CV-B3 et EV-71 a été rapportée (Leong et al., 2006 ; Rassmann et al., 2013).

Nous avons mis en évidence une hyperméthylation globale de l'ADN dans les cultures de cellules β infectées par CVB4 de manière persistante. Cette observation suggère que l'infection à CV-B4 a un impact sur le noyau des cellules et notamment sur l'ADN. La méthylation de l'ADN est associée à une régulation de l'expression des gènes. Il n'est pas exclu que l'effet de l'infection sur l'ADN que nous avons observé joue un rôle dans l'altération de l'expression de *PCSK2* et d'autres gènes. Des travaux complémentaires sont requis pour explorer cette hypothèse.

L'effet sur le noyau, et notamment sur l'ADN, que nous avons observé est intrigant puisque CV-B4 est un virus à ARN dont le cycle viral se déroule dans le cytoplasme. Il n'est pas exclu qu'il s'agisse d'un effet indirect, dû à des médiateurs cellulaires, mais l'hypothèse d'un effet direct du virus ne peut être écartée car il a déjà été rapporté que des protéines de virus de la famille des *Picornaviridae* peuvent se localiser au noyau (Grubman et al., 2008). La protéine VP1 de CV-B3 possède un signal de localisation nucléaire fonctionnel (Wang et al., 2012), et dans les cellules infectées par le virus de la fièvre aphteuse (Foot and Mouth Disease Virus) appartenant au genre *Cardiovirus*, la protéase virale 3C est capable de cliver l'histone H3 dans le noyau (Grigera et al., 1984 ; Falk et al., 1990).

L'infection persistante des cellules β par CV-B4 provoque une modification du métabolisme de l'insuline. De plus l'infection persistante a un impact sur de nombreuses protéines des cellules β comme le montre la spectrométrie de masse SHOTGUN dans notre étude. Cette méthode a déjà été mise à profit par d'autres équipes pour caractériser le protéome dans des lavages broncho-alvéolaire de patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine ou celui du myocarde de patients souffrant de cardiomyopathie dilatée (Nguyen et al., 2014 ; Hammer et al., 2011). La spectrométrie de masse SHOTGUN avec analyse du score SEQUEST a permis d'identifier près de 1700 protéines dans les cellules β au cours de cette étude. Le score d'identification de près de 500 protéines était modifié dans les cellules infectées par rapport aux contrôles. La différence de score était significative pour 47 d'entre elles. C'est le cas de EIF4G dont le score est diminué ce qui est en accord avec la notion du clivage de cette protéine par la protéase virale 2A des entérovirus dont la conséquence est l'inhibition de la traduction des protéines cellulaires (Hsu et al., 2009). C'est le cas également de l'isoforme 2 de HNRNP A3, dont le score est augmenté (Ma et al., 2002) et qui peut interagir avec les ARN cellulaires et viraux pour faciliter l'infection par le poliovirus (Jagdeo et al., 2015). La spectrométrie de masse Shotgun a mis en évidence une réduction du score des protéines Prph, Dbn1, et Map1A notamment, dans les cultures de cellules infectées par CV-B4 E2. L'impact de l'infection sur ces protéines peut jouer un rôle dans les anomalies de l'insuline que nous avons observées car elles sont impliquées dans le transport vésiculaire et la structure du cytosquelette,

et qu'il a été suggéré que le dysfonctionnement du transport des granules d'insuline peut altérer la maturation de l'insuline (Kawasaki 2012).

La spectrométrie de masse Shotgun apporte de nombreuses informations concernant le profil des protéines cellulaires dans les cellules β infectées par CV-B4. Cette approche ouvre des perspectives pour étudier les conséquences cellulaires de l'infection, néanmoins, d'autres stratégies conservent leur intérêt, puisque les perturbations du métabolisme de l'insuline (rapport Insuline/ proinsuline et inhibition de PCSK2) dans la présente étude ont été mises en évidence grâce à l'ELISA et à la RT-PCR en temps réel.

Dans notre modèle d'infection persistante à CV-B4E2 de cellules β , des anomalies des fonctions cellulaires, ainsi que des anomalies des protéines et de l'ADN ont été observées. Un défaut de maturation de l'insuline et une inhibition de la pro-hormone convertase impliquée dans les modifications post-traductionnelles de la proinsuline ont été mis en évidence. L'impact de l'infection à CV-B4 sur la maturation de l'insuline, avec libération de proinsuline par les cellules β que nous avons observé ouvre une nouvelle piste de réflexion concernant la pathogenèse virale du diabète puisqu'il a été montré antérieurement que la proinsuline joue un rôle dans le développement de l'auto-immunité dirigée contre les cellules β (Ciancaruso et al., 2017 ; So et al., 2018 ; Michels et al., 2017). Il reste à déterminer si l'impact épigénétique de CV-B4 sur les cellules β peut modifier la maturation de l'insuline. Des travaux seront réalisés dans cette direction dans notre laboratoire.

Partie III : Expression de HERV-W Env dans des cellules infectées par CV-B4

L'impact de CV-B4 sur l'expression d'HERV-W Env dans des macrophages et des cellules pancréatiques a été étudié.

Les monocytes sélectionnés par adhérence au plastique ont été cultivés en présence de M-CSF pendant 7 jours, pour obtenir des cultures de macrophages comme décrit précédemment (Alidjinou et al., 2017). La culture obtenue par adhérence est enrichie en monocytes, mais d'autres types cellulaires et notamment des lymphocytes T peuvent être présents (Delles et al., 2002). La cyclosporine A a été ajoutée aux cultures pour éliminer les lymphocytes T, comme décrit dans de précédentes études (Perron, 2001, virology). La protéine rétrovirale Env stimule la cytotoxicité des lymphocytes T (Tu et al., 2017 ; Firouzi et al., 2003). L'inhibition de l'activité de ces cellules par la CsA réduit le risque de lyse des cellules exprimant HERV-W Env par les lymphocytes T (Tu et al., 2017).

Les cellules pancréatiques sont obtenues à partir du pancréas de patient en état de mort cérébrale. La fraction exocrine du pancréas, appauvrie en îlots, est mise en culture avec de la généticine inhibant la croissance des fibroblastes. Ainsi la dédifférenciation des cellules exocrines permet d'obtenir une culture de cellules canalaire comme notre équipe l'a montré (Sane et al., 2013)

Il n'y avait pas d'ECP détectable dans les cultures de macrophages infectés par CV-B4 E2, cependant le titre infectieux du surnageant était $> 10^3$ TCID₅₀.mL⁻¹ à 48H p.i alors qu'il était $< 10^{1,5}$ TCID₅₀.mL⁻¹ qui est la limite de détection du test 6H p.i. Par ailleurs la détection d'ARN entéroviral intracellulaire par RT-qPCR, était positive dans des cultures de macrophages infectés par CV-B4 E2 (n=3) (data not shown). Le profil d'infection à CV-B4 E2 des macrophages que nous avons observé est similaire à celui décrit antérieurement par notre équipe (Alidjinou et al., 2015).

L'infection des cellules pancréatiques par CV-B4 E2 se caractérise par un ECP et une altération d'environ 50% du tapis cellulaire après 48 à 72 H d'infection. Le titre infectieux moyen du surnageant après 48H d'infection était 10^5 TCID₅₀.mL⁻¹, quelle que soit la MOI (0.01, 0.1 ou 1).

L'expression du gène HERV-W Env a été mesurée à l'aide d'une méthode de RT-qPCR décrite antérieurement détectant l'ARNm d'HERV-W Env chez les patients diabétiques, (Levet et al., 2017). La migration des produits de PCR en gel d'agarose ainsi que les courbes de dissociation des amplicons ont permis de vérifier la spécificité de la méthode (résultats non montrés). L'ARN total des macrophages infectés a été extrait 6h, 16H et 48H p.i. L'expression relative du gène HERV-W env dans les macrophages infectés par rapport aux macrophages contrôles a été exprimée en normalisant avec l'ARNm de la β -actine. Une augmentation de l'expression du gène HERV-W Env avec un rapport >2 , était obtenue dans les cultures de macrophages de 6 donneurs quand elles étaient infectées par CV-B4 (moyenne + écart-type : 4.41 ± 1.11). Les cultures de macrophages

et de cellules pancréatiques ont été incubées en présence d'un lysat de cellules HEp-2 afin de contrôler que les protéines cellulaires présentes dans les suspensions virales, issues de cultures de cellules HEp-2, n'induisaient pas l'expression d'HERV-W Env.

L'expression du gène HERV-W Env n'est pas différente dans les cellules 6 heures après l'infection par rapport à celle observée dans les contrôles. Par contre l'expression du gène est accrue dans les cellules 16h ou 48h après l'infection, avec une MOI de 1 ou de 10 dans le cas des macrophages et avec une MOI de 0.01, 0.1 ou 1 dans le cas des cellules pancréatiques. L'hyperexpression d'HERV-W Env a été induite par CV-B4 E2 dans les cultures de macrophages et de cellules canalaire. CV-B4 JVB a également provoqué cet effet dans les cultures de macrophages, mais il n'a pas été testé dans les cultures de cellules canalaire.

L'infection à CV-B4 stimule l'expression du gène HERV-W Env dans les cultures de macrophages de 6 donneurs sur 14, et dans les cultures de cellules pancréatiques de 4 individus sur 5 en mort cérébrale. Une variabilité interindividuelle de l'expression du gène HERV-W Env a été observée. Il n'est pas exclu que l'impact de l'infection à CV-B4 sur l'expression de HERV-W Env dépende de facteurs génétiques propres à chaque donneur. Une variabilité d'expression du gène HERV-W Env qui serait due à des facteurs génétiques a été constatée chez les sujets avec une SEP (Schmitt et al., 2013). Dans le génome humain, du fait de duplications du gène, de nombreux exemplaires du gène HERV-W Env se répartissent sur plusieurs chromosomes et en différents loci (Mameli et al., 2012). La variabilité interindividuelle que nous avons constatée peut être due à des différences de réponse à l'infection à CV-B4 ou à l'absence de copies du gène HERV-W Env répondeuses à cette stimulation. Ces hypothèses mériteraient d'être explorées pour mieux comprendre les mécanismes de l'expression du gène HERV-W Env et de la variabilité interindividuelle de réponse à l'infection à CV-B4.

La protéine HERV-W Env a été recherchée dans les cultures de macrophages et de cellules pancréatiques à l'aide d'une technique quantitative très sensible d'immunoblot permettant de détecter de faibles quantités de protéines (Levet et al., 2017). Dans les cellules pancréatiques infectées par CV-B4, la protéine Env a été détectée en quantité plus importante que dans les contrôles. À l'opposé les quantités de protéine dans les macrophages n'étaient pas différentes, dans les cultures infectées et les contrôles. Néanmoins la quantité d'ARN m d'HERV-W Env dans les cultures de macrophages infectés est plus élevée que celle détectée dans les contrôles. Il n'est pas exclu que la quantité de protéine Env dans les macrophages infectés soit inférieure au seuil de détection de notre méthode.

L'augmentation de quantité de protéine Env dans les cellules pancréatiques infectées par rapport aux contrôles est nettement supérieure à l'augmentation des quantités d'ARNm de HERV-W Env dans ces cellules. Par ailleurs il n'y a pas de corrélation concernant l'augmentation de la protéine Env et

l'augmentation de l'ARNm de HERV-W Env dans les macrophages. Ces observations suggèrent que l'infection à CV-B4 a un impact sur la transcription de HERV-W Env, mais aussi possiblement sur des mécanismes post-transcriptionnel, traductionnels et/ou post-traductionnel. Selon la modulation de ces processus, la protéine Env peut s'accumuler dans les cellules ou être indétectable.

Une expression accrue du gène HERV-W Env stimulée par des virus à ADN a été déjà obtenue dans différents systèmes in vitro : infection de lignées astrocytaires par EBV (Mameli et al., 2012), infection de cellules mononucléées du sang périphérique par HHV-6 (Charvet et al., 2018). De plus il a été rapporté une expression accrue du gène HERV-W Env dans les PBMC d'individus infectés par EBV (Mameli et al., 2013). Il a été observé que le virus Influenza A augmente l'expression de gènes de HERV, et notamment du gène *Env* in vitro dans des cellules nerveuses (lignée SK-N-MC)(Nellaker et al., 2006 ; Li et al., 2014). Ces virus à ADN et le virus influenza, qui est un virus à ARN, se multiplient dans le noyau des cellules. Par contre CV-B4 est un virus à ARN à multiplication cytoplasmique, les mécanismes impliqués dans l'effet des virus sur l'expression d'HERV-W Env mériteraient d'être explorés.

Chez des patients avec un DT1, l'activation de HERV-W Env a été mise en évidence : l'ARNm de Env a été retrouvé en quantité plus abondante que chez des sujets contrôles dans les CMN du sang périphérique, la protéine Env a été détectée dans le sérum et dans le pancréas exocrine des patients DT1. Nos résultats montrent que l'infection à CVB4 peut provoquer l'activation d'HERV-W Env dans des cellules primaires humaines et notamment des macrophages et des cellules pancréatiques. Ces observations ouvrent une nouvelle piste de réflexion concernant la pathogenèse virale du diabète de type 1. L'infection par un virus, tel que CV-B4, est capable d'activer un facteur endogène en l'occurrence HERV-W Env dont les effets pathogènes ont été rapportés ; inhibition de la sécrétion d'insuline par les cellules β ; induction d'auto-immunité par mimétisme moléculaire, et activité de type superantigène exacerbant la réponse immunitaire dirigée contre les cellules pancréatiques (Levet et al., 2017 , Grandi et al., 2018). Une meilleure connaissance des mécanismes de l'activation d'HERV-W Env par l'infection à CV-B4 et notamment des facteurs propres au virus et à l'hôte qui sont mis en jeu dans cette interaction est requise. Des travaux seront réalisés dans cette direction dans notre laboratoire.

Conclusion

Nos travaux mettent en évidence des modifications de la sécrétion de l'insuline lors de l'infection persistante par CV-B4 E2, sans que les cellules productrices d'insuline ne soient détruites. Des cultures de cellules canalaire humaines différenciées en amas cellulaires sécréteurs d'insuline ont pu être infectées de manière persistante par CV-B4. L'infection par CV-B4 E2 diminuait de manière significative la synthèse d'ARNm et de protéine insuline, et altérait la structure des amas cellulaires.

L'infection persistante à CV-B4 n'induisait pas de modification de la quantité d'insuline sécrétée dans une lignée de cellules β , mais modifiait la forme de l'insuline produite. Davantage de proinsuline était sécrétée dans les cellules infectées. La sous-expression de PCSK2, gène codant une enzyme clé de la maturation de l'insuline, a été identifiée comme un facteur contribuant à ce défaut de maturation. De nombreuses autres protéines, identifiées par spectrométrie de masse, sont impactées par l'infection, intervenant notamment dans le trafic intracellulaire, autre mécanisme pouvant intervenir dans le défaut de maturation de l'insuline des cellules infectées.

Un gène de rétrovirus endogène humain, HERV-W Env, a été associé à la pathogénèse du DT1. Des cultures de macrophages dérivés de CMN humaines ont été infectées par CV-B4. L'expression de HERV-W Env a été retrouvée augmentée lors de l'infection. Une observation similaire a été faite lors de l'infection de cellules pancréatiques humaines. Dans les cellules pancréatiques, la protéine HERV-W Env était jusqu'à 20 fois plus abondante lors de l'infection que dans les cellules contrôles.

CV-B4 est associé à la pathogénèse du DT1, bien que les mécanismes à l'œuvre ne soient pas encore totalement élucidés. De nombreuses hypothèses reposent soit sur une lyse des cellules sécrétrices d'insuline, soit sur une induction de l'auto-immunité, conduisant à la destruction des cellules β . Dans ce travail, une inhibition de la synthèse d'insuline, sans qu'il y ait de lyse cellulaire, est rapportée.

CV-B4 induit une surexpression de HERV-W Env. Cette protéine rétrovirale a des propriétés inflammatoires, auto-immunes, et inhibe la production d'insuline par les cellules β . HERV-W Env pourrait être un intermédiaire des mécanismes pathologiques de CV-B4 dans le DT1.

Ce travail apporte des données nouvelles concernant la persistance de CV-B4 dans des cellules pancréatiques, et le rôle du virus dans la pathogénèse du DT1.

Liste des publications

Bertin A, Sane F, Gmyr V, Lobert D, Dechaumes A, Kerr-Conte J, Pattou F, Hober D. Coxsackievirus-B4 Infection of Human Primary Pancreatic Ductal Cell Cultures Results in Impairment of Differentiation into Insulin-Producing Cells. *Viruses*. 2019 ;11(7). pii: E597.

Benkahla MA, Sane F, **Bertin A**, Vreulx AC, Elmastour F, Jaidane H, Desailoud R, Hober D. Impact of coxsackievirus-B4E2 combined with a single low dose of streptozotocin on pancreas of outbred mice: investigation of viral load, pathology and inflammation. *Sci Rep*. 2019 ;9(1):10080.

Nekoua MP, **Bertin A**, Sane F, Alidjinou EK, Lobert D, Trauet J, Hober C, Engelmann I, Moutairou K, Yessoufou A, Hober D. Pancreatic β cells persistently infected with coxsackievirus B4 are targets of NK cell-mediated cytolytic activity. *Cell Mol Life Sci*. 2019 [Epub ahead of print]

Alidjinou EK, **Bertin A**, Sane F, Caloone D, Engelmann I, Hober D. Emergence of Fluoxetine-Resistant Variants during Treatment of Human Pancreatic Cell Cultures Persistently Infected with Coxsackievirus B4. *Viruses*. 2019 ;11(6). pii: E486.

Engelmann I, Alidjinou EK, **Bertin A**, Sane F, Hober D. miRNAs in enterovirus infection. *Crit Rev Microbiol*. 2018 ;44(6):701-714.

Ferlin J, Farhat R, Belouzard S, Cocquerel L, **Bertin A**, Hober D, Dubuisson J, Rouillé Y. Investigation of the role of GBF1 in the replication of positive-sense single-stranded RNA viruses. *J Gen Virol*. 2018 ;99(8):1086-1096.

Engelmann I, Alidjinou EK, **Bertin A**, Bossu J, Villenet C, Figeac M, Sane F, Hober D. Persistent coxsackievirus B4 infection induces microRNA dysregulation in human pancreatic cells. *Cell Mol Life Sci*. 2017 ;74(20):3851-3861.

Elmastour F, Jaïdane H, Benkahla M, Aguech-Oueslati L, Sane F, Halouani A, Engelmann I, **Bertin A**, Mokni M, Gharbi J, Aouni M, Alidjinou EK, Hober D. Anti-coxsackievirus B4 (CV-B4) enhancing activity of serum associated with increased viral load and pathology in mice reinfected with CV-B4. *Virulence*. 2017 ;8(6):908-923.

Alidjinou EK, Sané F, **Bertin A**, Caloone D, Hober D. Persistent infection of human pancreatic cells with Coxsackievirus B4 is cured by fluoxetine. *Antiviral Res*. 2015 ;116:51-4.

Bibliographie

Alidjinou EK, Chehadeh W, Weill J, Vantighem MC, Stuckens C, Decoster A, Hober C, Hober D. Monocytes of Patients with Type 1 Diabetes Harbour Enterovirus RNA. *Eur J Clin Invest.* 2015 ;45(9):918-24.

Alidjinou EK, Engelmann I, Bossu J, Villenet C, Figeac M, Romond MB, Sané F, Hober D. Persistence of Coxsackievirus B4 in pancreatic ductal-like cells results in cellular and viral changes. *Virulence.* 2017 ;8(7):1229-1244.

Alidjinou EK, Sané F, Engelmann I, Geenen V, Hober D. Enterovirus persistence as a mechanism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Discov Med.* 2014 ;18(100):273-82.

Alidjinou EK, Sané F, Trauet J, Copin MC, Hober D. Coxsackievirus B4 Can Infect Human Peripheral Blood-Derived Macrophages. *Viruses.* 2015 ;7(11):6067-79.

Anagandula M, Richardson SJ, Oberste MS, Sioofy-Khojine AB, Hyöty H, Morgan NG, Korsgren O, Frisk G. Infection of human islets of Langerhans with two strains of Coxsackie B virus serotype 1: assessment of virus replication, degree of cell death and induction of genes involved in the innate immunity pathway. *J Med Virol.* 2014 ;86(8):1402-11.

Ataei-Pirkooh A, Tehrani M, Keyvani H, Esghaei M, Tavakoli A, Nikmanesh B, Farahmand M, Ghaffari H, Monavari SH. Rotavirus Infection Enhances Levels of Autoantibodies Against Islet Cell Antigens GAD65 and IA-2 in Children with Type 1 Diabetes. *Fetal Pediatr Pathol.* 2019 ;38(2):103-111.

Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2001 ;358(9277):221-9.

Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, McKenna WJ. Coxsackie B viruses and human heart disease. In *The Coxsackie B Viruses*. Tracy S, Chapman NM, Mahy BWJ, editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1997; 1997. p. 191-209.

Badia-Boungou F, Sane F, Alidjinou EK, Ternois M, Opoko PA, Haddad J, Stukens C, Lefevre C, Gueorguieva I, Hamze M, Ismail M, Weill J, Monabéka HG, Bouenizabila E, Moukassa D, Abena AA, Hober D. Marker of coxsackievirus-B4 infection in saliva of patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2017 ;33(7).

Bauer L, Manganaro R, Zonsics B, Strating JRPM, El Kazzi P, Lorenzo Lopez M, Ulferts R, van Hoey C, Maté MJ, Langer T, Coutard B, Brancale A, van Kuppeveld FJM. Fluoxetine Inhibits Enterovirus Replication by Targeting the Viral 2C Protein in a Stereospecific Manner. *ACS Infect Dis.* 2019 [Epub ahead of print].

Bergamin CS, Dib SA. Enterovirus and type 1 diabetes: What is the matter? *World J Diabetes.* 2015 ;6(6):828-39.

Bertin A, Sane F, Gmyr V, Lobert D, Dechaumes A, Kerr-Conte J, Pattou F, Hober D. Coxsackievirus-B4 Infection of Human Primary Pancreatic Ductal Cell Cultures Results in Impairment of Differentiation into Insulin-Producing Cells. *Viruses.* 2019 ;11(7). pii: E597.

Bian X, Wallstrom G, Davis A, Wang J, Park J, Throop A, Steel J, Yu X, Wasserfall C, Schatz D, Atkinson M, Qiu J, LaBaer J. Immunoproteomic Profiling of Antiviral Antibodies in New-Onset Type 1 Diabetes Using Protein Arrays. *Diabetes*. 2016 ;65(1):285-96.

Bird SW, Maynard ND, Covert MW, Kirkegaard K. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 ;111(36):13081-6.

Bouin A, Gretteau PA, Wehbe M, Renois F, N'Guyen Y, Lévêque N, Vu MN, Tracy S, Chapman NM, Bruneval P, Fornes P, Semler BL, Andreoletti L. Enterovirus Persistence in Cardiac Cells of Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy Is Linked to 5' Terminal Genomic RNA-Deleted Viral Populations With Viral-Encoded Proteinase Activities. *Circulation*. 2019 ;139(20):2326-2338

Brilot F, Geenen V, Hober D, Stoddart CA. Coxsackievirus B4 infection of human fetal thymus cells. *J Virol*. 2004 ;78(18):9854-61.

Brilot F, Jaidane H, Geenen V, Hober D. Coxsackievirus B4 infection of murine foetal thymus organ cultures. *J Med Virol*. 2008 ;80(4):659-66.

Buzzetti R, Quattrocchi CC, Nisticò L. Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence. *Diabetes Metab Rev*. 1998 ;14(2):111-28.

Carthy CM, Yanagawa B, Luo H, Granville DJ, Yang D, Cheung P, Cheung C, Esfandiarei M, Rudin CM, Thompson CB, Hunt DW, McManus BM. Bcl-2 and Bcl-xL overexpression inhibits cytochrome c release, activation of multiple caspases, and virus release following coxsackievirus B3 infection. *Virology*. 2003 ;313(1):147-57.

Chapman NM, Kim KS, Drescher KM, Oka K, Tracy S. 5' terminal deletions in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. *Virology*. 2008 ;375(2):480-91.

Charvet B, Reynaud JM, Gourru-Lesimple G, Perron H, Marche PN, Horvat B. Induction of Proinflammatory Multiple Sclerosis-Associated Retrovirus Envelope Protein by Human Herpesvirus-6A and CD46 Receptor Engagement. *Front Immunol*. 2018 ;9:2803.

Cehadeh W, Kerr-Conte J, Pattou F, Alm G, Lefebvre J, Wattré P, Hober D. Persistent infection of human pancreatic islets by coxsackievirus B is associated with alpha interferon synthesis in beta cells. *J Virol*. 2000 ;74(21):10153-64.

Cehadeh W, Lobert PE, Sauter P, Goffard A, Lucas B, Weill J, Vantyghem MC, Alm G, Pigny P, Hober D. Viral protein VP4 is a target of human antibodies enhancing coxsackievirus B4- and B3-induced synthesis of alpha interferon. *J Virol*. 2005 ;79(22):13882-91.

Cehadeh W, Weill J, Vantyghem MC, Alm G, Lefebvre J, Wattré P, Hober D. Increased level of interferon-alpha in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with coxsackievirus B infection. *J Infect Dis*. 2000 ;181(6):1929-39.

Cianciaruso C, Phelps EA, Pasquier M, Hamelin R, Demurtas D, Alibashe Ahmed M, Piemonti L, Hirosue S, Swartz MA, De Palma M, Hubbell JA, Baekkeskov S. Primary Human and Rat β -Cells Release the Intracellular Autoantigens GAD65, IA-2, and Proinsulin in Exosomes Together With Cytokine-Induced Enhancers of Immunity. *Diabetes*. 2017 ;66(2):460-473.

Clarke EV, Tenner AJ. Complement modulation of T cell immune responses during homeostasis and disease. *J Leukoc Biol*. 2014 ;96(5):745-56.

Cong H, Du N, Yang Y, Song L, Zhang W, Tien P. Enterovirus 71 2B Induces Cell Apoptosis by Directly Inducing the Conformational Activation of the Proapoptotic Protein Bax. *J Virol.* 2016 ;90(21):9862-9877.

Davidson HW, Rhodes CJ, Hutton JC. Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature.* 1988 ;333(6168):93-6

Delles AM, Rittenhouse-Olson K, Morgan J, Oseroff AR. A simple method for the purification of human peripheral blood antigen presenting cells (dendritic cells, monocytes/macrophages, and B lymphocytes). *Immunol Invest.* 2002 (3-4):233-45.

Denning SM, Kurtzberg J, Le PT, Tuck DT, Singer KH, Haynes BF. Human thymic epithelial cells directly induce activation of autologous immature thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 ;85(9):3125-9.

Desailloud R, Sané F, Caloone D, Hober D. Persistent infection of a carcinoma thyroid cell line with coxsackievirus B. *Thyroid.* 2009 ;19(4):369-74.

Dolei A. The aliens inside us: HERV-W endogenous retroviruses and multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2018 ;24(1):42-47.

Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Del Prato S, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 ;104(12):5115-20.

Du Pasquier R, Meylan P, Kaiser L., Lalive PH. Encéphalites virales. *Rev Med Suisse* 2009 ;5.968-973

Duperray A, Barbe D, Raguenez G, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Perron H, Marche PN. Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4. *Int Immunol.* 2015 ;27(11):545-53.

Engelmann I, Alidjinou EK, Bertin A, Bossu J, Villenet C, Figeac M, Sane F, Hober D. Persistent coxsackievirus B4 infection induces microRNA dysregulation in human pancreatic cells. *Cell Mol Life Sci.* 2017 ;74(20):3851-3861.

Engelmann I, Alidjinou EK, Bertin A, Sane F, Hober D. miRNAs in enterovirus infection. *Crit Rev Microbiol.* 2018 ;44(6):701-714.

Falk MM, Grigera PR, Bergmann IE, Zibert A, Multhaup G, Beck E. Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J Virol.* 1990 ;64(2):748-56.

Feuer R, Pagarigan RR, Harkins S, Liu F, Hunziker IP, Whitton JL. Coxsackievirus targets proliferating neuronal progenitor cells in the neonatal CNS. *J Neurosci.* 2005 ;25(9):2434-44.

Feuer R, Mena I, Pagarigan R, Slifka MK, Whitton JL. Cell cycle status affects coxsackievirus replication, persistence, and reactivation in vitro. *J Virol.* 2002 ;76(9):4430-40.

Feuer R, Ruller CM, An N, Tabor-Godwin JM, Rhoades RE, Maciejewski S, Pagarigan RR, Cornell CT, Crocker SJ, Kiosses WB, Pham-Mitchell N, Campbell IL, Whitton JL. Viral persistence and chronic immunopathology in the adult central nervous system following Coxsackievirus infection during the neonatal period. *J Virol.* 2009 ;83(18):9356-69.

Firouzi R, Rolland A, Michel M, Jouvin-Marche E, Hauw JJ, Malcus-Vocanson C, Lazarini F, Gebuhrer L, Seigneurin JM, Touraine JL, Sanhadji K, Marche PN, Perron H. Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J Neurovirol.* 2003 ;9(1):79-93.

Frisk G, Tuvemo T. Enterovirus infections with beta-cell tropic strains are frequent in siblings of children diagnosed with type 1 diabetes children and in association with elevated levels of GAD65 antibodies. *J Med Virol.* 2004 ;73(3):450-9.

Garmaroudi FS, Marchant D, Hendry R, Luo H, Yang D, Ye X, Shi J, McManus BM. Coxsackievirus B3 replication and pathogenesis. *Future Microbiol.* 2015;10(4):629-53.

Geenen V, Brilot F. Role of the thymus in the development of tolerance and autoimmunity towards the neuroendocrine system. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 ;992:186-95.

Gmyr V, Kerr-Conte J, Belaich S, Vandewalle B, Leteurtre E, Vantyghem MC, Lecomte-Houcke M, Proye C, Lefebvre J, Pattou F. Adult human cytokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 in vitro: further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans. *Diabetes.* 2000 ;49(10):1671-80.

Goffard A, Alidjinou EK, Sané F, Choteau L, Bouquillon C, Caloone D, Lobert PE, Hober D. Antibodies enhance the infection of phorbol-ester-differentiated human monocyte-like cells with coxsackievirus B4. *Microbes Infect.* 2013 ;15(1):18-27.

Gradi A, Svitkin YV, Imataka H, Sonenberg N. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl AcadSci U S A* 1998;95(19):11089–11094.

Grandi N, Tramontano E. Human Endogenous Retroviruses Are Ancient Acquired Elements Still Shaping Innate Immune Responses. *Front Immunol.* 2018 ;9:2039.

Grigera PR, Tisminetzky SG. Histone H3 modification in BHK cells infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology.* 1984 ;136(1):10-9.

Grubman MJ, Moraes MP, Diaz-San Segundo F, Pena L, de los Santos T. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 ;53(1):8-17.

Hammer E, Goritzka M, Ameling S, Darm K, Steil L, Klingel K, Trimpert C, Herda LR, Dörr M, Kroemer HK, Kandolf R, Staudt A, Felix SB, Völker U. Characterization of the human myocardial proteome in inflammatory dilated cardiomyopathy by label-free quantitative shotgun proteomics of heart biopsies. *J Proteome Res.* 2011 ;10(5):2161-71.

Hardikar AA, Marcus-Samuels B, Geras-Raaka E, Raaka BM, Gershengorn MC. Human pancreatic precursor cells secrete FGF2 to stimulate clustering into hormone-expressing islet-like cell aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 ;100(12):7117-22.

Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes.* 2000 ;49(11):1751-60.

Hober D, Alidjinou EK. Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes: queries and answers. *Curr Opin Infect Dis.* 2013 ;26(3):263-9.

Hober D, Sauter P. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol*. 2010 ;6(5):279-89.

Hober D, Chehadeh W, Bouzidi A, Wattré P. Antibody-dependent enhancement of coxsackievirus B4 infectivity of human peripheral blood mononuclear cells results in increased interferon-alpha synthesis. *J Infect Dis*. 2001 ;184(9):1098-108.

Hober D, Chehadeh W, Weill J, Hober C, Vantghem MC, Gronnier P, Wattré P. Circulating and cell-bound antibodies increase coxsackievirus B4-induced production of IFN-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 1 diabetes. *J Gen Virol*. 2002 ;83(Pt 9):2169-76.

Hober D, Sane F, Jaïdane H, Riedweg K, Goffard A, Desaillood R. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: role of antibodies enhancing the infection with Coxsackievirus-B in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2012 ;168(1):47-51.

Hodik M, Skog O, Lukinius A, Isaza-Correa JM, Kuipers J, Giepmans BN, Frisk G. Enterovirus infection of human islets of Langerhans affects β -cell function resulting in disintegrated islets, decreased glucose stimulated insulin secretion and loss of Golgi structure. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2016 ;4(1):e000179.

Honeyman MC, Laine D, Zhan Y, Londrigan S, Kirkwood C, Harrison LC. Rotavirus infection induces transient pancreatic involution and hyperglycemia in weanling mice. *PLoS One*. 2014 ;9(9):e106560.

Horne MA, Flemming KD, Su IC, Stapf C, Jeon JP, Li D, Maxwell SS, White P, Christianson TJ, Agid R, Cho WS, Oh CW, Wu Z, Zhang JT, Kim JE, Ter Brugge K, Willinsky R, Brown RD Jr, Murray GD, Al-Shahi Salman R; Cerebral Cavernous Malformations Individual Patient Data Meta-analysis Collaborators. Clinical course of untreated cerebral cavernous malformations: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Neurol*. 2016 ;15(2):166-173.

Hsu YY, Liu YN, Lu WW, Kung SH. Visualizing and quantifying the differential cleavages of the eukaryotic translation initiation factors eIF4GI and eIF4GII in the enterovirus-infected cell. *Biotechnol Bioeng*. 2009 ;104(6):1142-52.

Hyöty H. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med*. 2002;34(3):138-47.

Hyöty H. Viruses in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2016 ;17 Suppl 22:56-64.

Isaacs SR, Wang J, Kim KW, Yin C, Zhou L, Mi QS, Craig ME. MicroRNAs in Type 1 Diabetes: Complex Interregulation of the Immune System, β Cell Function and Viral Infections. *Curr Diab Rep*. 2016 ;16(12):133.

Jagdeo JM, Dufour A, Fung G, Luo H, Kleifeld O, Overall CM, Jan E. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein M Facilitates Enterovirus Infection. *J Virol*. 2015 ;89(14):7064-78.

Jaïdane H, Caloone D, Lobert PE, Sane F, Dardenne O, Naquet P, Gharbi J, Aouni M, Geenen V, Hober D. Persistent infection of thymic epithelial cells with coxsackievirus B4 results in decreased expression of type 2 insulin-like growth factor. *J Virol*. 2012 ;86(20):11151-62.

Jaïdane H, Hober D. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab*. 2008 ;34(6 Pt 1):537-48.

Jaïdane H, Sané F, Hiar R, Goffard A, Gharbi J, Geenen V, Hober D. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: enterovirus, thymus and type 1 diabetes pathogenesis. *Clin Exp Immunol.* 2012 ;168(1):39-46.

Jaïdane H, Sauter P, Sane F, Goffard A, Gharbi J, Hober D. Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Rev Med Virol.* 2010 ;20(5):265-80.

Jaramillo L, Smithee S, Tracy S, Chapman NM. Domain I of the 5' non-translated genomic region in coxsackievirus B3 RNA is not required for productive replication. *Virology.* 2016 ;496:127-130.

Jensen KJ, Garmaroudi FS, Zhang J, Lin J, Boroomand S, Zhang M, Luo Z, Yang D, Luo H, McManus BM, Janes KA. An ERK-p38 subnetwork coordinates host cell apoptosis and necrosis during coxsackievirus B3 infection. *Cell Host Microbe.* 2013 ;13(1):67-76.

Joo CH, Kim YK, Lee H, Hong H, Yoon SY, Kim D. Coxsackievirus B4-induced neuronal apoptosis in rat cortical cultures. *Neurosci Lett.* 2002 ;326(3):175-8.

Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, Stengård J, Kesäniemi YA. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia.* 1992 ;35(11):1060-7.

Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 ;3:17016.

Kawasaki E. ZnT8 and type 1 diabetes. *Endocr J.* 2012;59(7):531-7.

Klein D, Álvarez-Cubela S, Lanzoni G, Vargas N, Prabakar KR, Boulina M, Ricordi C, Inverardi L, Pastori RL, Domínguez-Bendala J. BMP-7 Induces Adult Human Pancreatic Exocrine-to-Endocrine Conversion. *Diabetes.* 2015 ;64(12):4123-34.

Kobayashi T, Nishida Y, Tanaka S, Aida K. Pathological changes in the pancreas of fulminant type 1 diabetes and slowly progressive insulin-dependent diabetes mellitus (SPIDDM): innate immunity in fulminant type 1 diabetes and SPIDDM. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011 ;27(8):965-70.

Koide H, Kitaura Y, Deguchi H, Ukimura A, Kawamura K, Hirai K. Genomic detection of enteroviruses in the myocardium--studies on animal hearts with coxsackievirus B3 myocarditis and endomyocardial biopsies from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J.* 1992 ;56(10):1081-93.

Krogvold L, Edwin B, Buanes T, Frisk G, Skog O, Anagandula M, Korsgren O, Undlien D, Eike MC, Richardson SJ, Leete P, Morgan NG, Oikarinen S, Oikarinen M, Laiho JE, Hyöty H, Ludvigsson J, Hanssen KF, Dahl-Jørgensen K. Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2015 ;64(5):1682-7.

Kronenberg-Versteeg D, Eichmann M, Russell MA, de Ru A, Hehn B, Yusuf N, van Veelen PA, Richardson SJ, Morgan NG, Lemberg MK, Peakman M. Molecular Pathways for Immune Recognition of Preproinsulin Signal Peptide in Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2018 ;67(4):687-696.

Kukreja A, Maclaren NK. Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: immune-mediated (type 1) diabetes. *Cell Mol Life Sci.* 2000 ;57(4):534-41.

Kumar D, Gemayel NS, Deapen D, Kapadia D, Yamashita PH, Lee M, Dwyer JH, Roy-Burman P, Bray GA, Mack TM. North-American twins with IDDM. Genetic, etiological, and clinical significance of

disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin. *Diabetes*. 1993 ;42(9):1351-63.

Lai JK, Sam IC, Chan YF. The Autophagic Machinery in Enterovirus Infection. *Viruses*. 2016 ;8(2). pii: E32.

Laitinen OH, Honkanen H, Pakkanen O, Oikarinen S, Hankaniemi MM, Huhtala H, Ruokoranta T, Lecouturier V, André P, Harju R, Virtanen SM, Lehtonen J, Almond JW, Simell T, Simell O, Ilonen J, Veijola R, Knip M, Hyöty H. Coxsackievirus B1 is associated with induction of β -cell autoimmunity that portends type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014 ;63(2):446-55.

Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol*. 1994 ;266(2 Pt 1):C319-34.

Lee YR, Wang PS, Wang JR, Liu HS. Enterovirus 71-induced autophagy increases viral replication and pathogenesis in a suckling mouse model. *J Biomed Sci*. 2014 ;21:80.

Lee J, Sugiyama T, Liu Y, Wang J, Gu X, Lei J, Markmann JF, Miyazaki S, Miyazaki J, Szot GL, Bottino R, Kim SK. Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *Elife*. 2013 ;2:e00940.

Leong WF, Chow VT. Transcriptomic and proteomic analyses of rhabdomyosarcoma cells reveal differential cellular gene expression in response to enterovirus 71 infection. *Cell Microbiol*. 2006 ;8(4):565-80.

Levet S, Medina J, Joanou J, Demolder A, Queruel N, Réant K, Normand M, Seffals M, Dimier J, Germi R, Piofczyk T, Portoukalian J, Touraine JL, Perron H. An ancestral retroviral protein identified as a therapeutic target in type-1 diabetes. *JCI Insight*. 2017 ;2(17). pii: 94387.

Li F, Nellåker C, Sabunciyan S, Yolken RH, Jones-Brando L, Johansson AS, Owe-Larsson B, Karlsson H. Li F, Nellåker C, Sabunciyan S, Yolken RH, Jones-Brando L, Johansson AS, Owe-Larsson B, Karlsson H. Transcriptional derepression of the ERVWE1 locus following influenza A virus infection. *J Virol*. 2014 ;88(8):4328-37.

Lind A, Lynch KF, Lundgren M, Lernmark Å, Almgren P, Ramelius A, Puustinen L, Hyöty H, Lundstig A. First trimester enterovirus IgM and beta cell autoantibodies in mothers to children affected by type 1 diabetes autoimmunity before 7 years of age. *J Reprod Immunol*. 2018 ;127:1-6.

Lombardi A, Tomer Y. Interferon alpha impairs insulin production in human beta cells via endoplasmic reticulum stress. *J Autoimmun*. 2017 ;80:48-55.

Loustalot F, Kremer EJ, Salinas S. Membrane Dynamics and Signaling of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2016;322:331-62.

Ma AS, Moran-Jones K, Shan J, Munro TP, Snee MJ, Hoek KS, Smith R. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, a novel RNA trafficking response element-binding protein. *J Biol Chem*. 2002 ;277(20):18010-20.

Mameli G, Madeddu G, Mei A, Uleri E, Poddighe L, Delogu LG, Maida I, Babudieri S, Serra C, Manetti R, Mura MS, Dolei A. Activation of MSR V-type endogenous retroviruses during infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus latency: the missing link with multiple sclerosis? *PLoS One*. 2013 ;8(11):e78474.

Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Sotgiu S, Serra C, Manetti R, Dolei A. Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. *PLoS One*. 2012;7(9):e44991.

Michaux H, Martens H, Jaïdane H, Halouani A, Hober D, Geenen V. How Does Thymus Infection by Coxsackievirus Contribute to the Pathogenesis of Type 1 Diabetes? *Front Immunol*. 2015 ;6:338.

Michels AW, Landry LG, McDaniel KA, Yu L, Campbell-Thompson M, Kwok WW, Jones KL, Gottlieb PA, Kappler JW, Tang Q, Roep BO, Atkinson MA, Mathews CE, Nakayama M. Islet-Derived CD4 T Cells Targeting Proinsulin in Human Autoimmune Diabetes. *Diabetes*. 2017 ;66(3):722-734.

Moya-Suri V, Schlosser M, Zimmermann K, Rjasanowski I, Gürtler L, Mentel R. RNA sequences in sera of schoolchildren in the general population and their association with type 1-diabetes-associated autoantibodies. *J Med Microbiol*. 2005 ;54(Pt 9):879-83.

Muckelbauer JK and Rossman MG. The structure of Coxsackievirus B3. In *The Coxsackie B Viruses*. Tracy S, Chapman NM, Mahy BWJ, editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1997; 1997. p. 191-209.

Mutsafi Y, Altan-Bonnet N. Enterovirus Transmission by Secretory Autophagy. *Viruses*. 2018 ;10(3). pii: E139.

Nair S, Leung KC, Rawlinson WD, Naing Z, Craig ME. Enterovirus infection induces cytokine and chemokine expression in insulin-producing cells. *J Med Virol*. 2010 ;82(11):1950-7.

Nekoua MP, Bertin A, Sane F, Alidjinou EK, Lobert D, Trauet J, Hober C, Engelmann I, Moutairou K, Yessoufou A, Hober D. Pancreatic beta cells persistently infected with coxsackievirus B4 are targets of NK cell-mediated cytolytic activity. *Cell Mol Life Sci*. 2019. [Epub ahead of print]

Nellåker C, Yao Y, Jones-Brando L, Mallet F, Yolken RH, Karlsson H. Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology*. 2006 ;3:44.

Ng CG, Coppens I, Govindarajan D, et al. Effect of host cell lipid metabolism on alphavirus replication, virion morphogenesis, and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16326–16331.

Nguyen EV, Gharib SA, Crothers K, Chow YH, Park DR, Goodlett DR, Schnapp LM. Proteomic landscape of bronchoalveolar lavage fluid in human immunodeficiency virus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 ;306(1):L35-42.

Niegowska M, Wajda-Cuszlag M, Stępień-Ptak G, Trojanek J, Michałkiewicz J, Szalecki M, Sechi LA. Anti-HERV-W_{Env} antibodies are correlated with seroreactivity against *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in children and youths at T1D risk. *Sci Rep*. 2019 ;9(1):6282.

Nikonov OS, Chernykh ES, Garber MB, Nikonova EY. Enteroviruses: Classification, Diseases They Cause, and Approaches to Development of Antiviral Drugs. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(13):1615-1631.

Nilsson AL, Vaziri-Sani F, Broberg P, Elfaitouri A, Pipkorn R, Blomberg J, Ivarsson SA, Elding Larsson H, Lernmark Å. Serological evaluation of possible exposure to Ljungar virus and related parechovirus in autoimmune (type 1) diabetes in children. *J Med Virol*. 2015 ;87(7):1130-40.

Oikarinen M, Tauriainen S, Honkanen T, Oikarinen S, Vuori K, Kaukinen K, Rantala I, Mäki M, Hyöty H. Detection of enteroviruses in the intestine of type 1 diabetic patients. *Clin Exp Immunol*. 2008 ;151(1):71-5.

Oikarinen M, Tauriainen S, Oikarinen S, Honkanen T, Collin P, Rantala I, Mäki M, Kaukinen K, Hyöty H. Type 1 diabetes is associated with enterovirus infection in gut mucosa. *Diabetes*. 2012 ;61(3):687-91.

Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD. The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia*. 1988 ;31(10):747-50.

Op de Beeck A, Eizirik DL. Viral infections in type 1 diabetes mellitus--why the β cells? *Nat Rev Endocrinol*. 2016 ;12(5):263-273.

Palacios G, Oberste MS. Enterovirus as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol* 2005 ;11(5):424-33.

Palacios G, Oberste MS. Enterovirus as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol* 2005 ;11(5):424-33.

Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A et al. Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology*. 2001;287(2):321-32.

Perron H, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Genoulaz O, Geny C, Mallaret M, Schuller E, Stoebner P, Seigneurin JM. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet*. 1991 ;337(8745):862-3.

Perron H, Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010 ;39(1):51-61.

Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, Péchoux-Longin C, Seilhean D, Sazdovitch V, Créange A, Battail-Poirot N, Sibäi G, Santoro L, Jolivet M, Darlix JL, Rieckmann P, Arzberger T, Hauw JJ, Lassmann H. Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol*. 2005 ;11(1):23-33.

Petersen JS, Kyvik KO, Bingley PJ, Gale EA, Green A, Dyrberg T, Beck-Nielsen H. Population based study of prevalence of islet cell autoantibodies in monozygotic and dizygotic Danish twin pairs with insulin dependent diabetes mellitus. *BMJ*. 1997 ;314(7094):1575-9.

Petzold A, Solimena M, Knoch KP. Mechanisms of Beta Cell Dysfunction Associated With Viral Infection. *Curr Diab Rep*. 2015 ;15(10):73.

Pinkert S, Klingel K, Lindig V, Dörner A, Zeichhardt H, Spiller OB, Fechner H. Virus-host coevolution in a persistently coxsackievirus B3-infected cardiomyocyte cell line. *J Virol*. 2011 ;85(24):13409-19.

Pister T, Pasamontes L, Troxler M, et al. Immunocytochemical localization of capsid-related particles in subcellular fractions of poliovirusinfected cells. *Virology* 1992;188:676-684.

Pister T, Wimmer E. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol* 2001;75:1611-1619.

Principi N, Berioli MG, Bianchini S, Esposito S. Type 1 diabetes and viral infections: What is the relationship? *J Clin Virol*. 2017 ;96:26-31.

Rassmann A, Martin U, Saluz HP, Peter S, Munder T, Henke A. Identification of gene expression profiles in HeLa cells and HepG2 cells infected with Coxsackievirus B3. *J Virol Methods*. 2013 ;187(1):190-4.

Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, Feuer R. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*. 2011 ;411(2):288-305.

Riabi S, Gaaloul I, Harrath R, Aouni M. Persistent infection of human intestinal Caco-2 cell line by Coxsackieviruses B. *Pathol Biol (Paris)*. 2012 ;60(6):347-51.

Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009 ;52(6):1143-51.

Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW. Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes*. 1989 38(Suppl 1):140-142

Robinson SM, Tsueng G, Sin J, Mangale V, Rahawi S, McIntyre LL, Williams W, Kha N, Cruz C, Hancock BM, Nguyen DP, Sayen MR, Hilton BJ, Doran KS, Segall AM, Wolkowicz R, Cornell CT, Whitton JL, Gottlieb RA, Feuer R. Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog*. 2014 ;10(4):e1004045.

Rodriguez-Calvo T. Enterovirus infection and type 1 diabetes: unraveling the crime scene. *Clin Exp Immunol*. 2019 ;195(1):15-24.

Roivainen M, Knip M, Hyöty H, Kulmala P, Hiltunen M, Vähäsalo P, Hovi T, Akerblom HK. Several different enterovirus serotypes can be associated with prediabetic autoimmune episodes and onset of overt IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *J Med Virol*. 1998 ;56(1):74-8.

Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol*. 2006;176(12):7636-44.

Romero JR, Price C, Dunn JJ. Genetic Divergence Among the Group B Coxsackieviruses. In *The Coxsackie B Viruses*. Tracy S, Chapman NM, Mahy BWJ, editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1997; 1997. p. 191-209

Salonen A, Ahola T, Kaariainen L. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;285:139-173.

Sane F, Caloone D, Gmyr V, Engelmann I, Belaich S, Kerr-Conte J, Pattou F, Desailoud R, Hober D. Coxsackievirus B4 can infect human pancreas ductal cells and persist in ductal-like cell cultures which results in inhibition of Pdx1 expression and disturbed formation of islet-like cell aggregates. *Cell Mol Life Sci*. 2013 ;70(21):4169-80.

Saresella M, Rolland A, Marventano I, Cavarretta R, Caputo D, Marche P et al. Multiple sclerosis-associated retroviral agent (MSRV)-stimulated cytokine production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009;15(4):443-7.

Sarmiento L, Medina A, Aziz K, Anagandula M, Cabrera-Rode E, Fex M, Frisk G, Cilio CM. Differential effects of three echovirus strains on cell lysis and insulin secretion in beta cell derived lines. *J Med Virol*. 2016 ;88(6):971-8.

Schmitt K, Richter C, Backes C, Meese E, Ruprecht K, Mayer J. Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus group HERV-W locus transcription in multiple sclerosis brain lesions by high-throughput amplicon sequencing. *J Virol.* 2013 ;87(24):13837-52.

Sioofy-Khojine AB, Lehtonen J, Nurminen N, Laitinen OH, Oikarinen S, Huhtala H, Pakkanen O, Ruokoranta T, Hankaniemi MM, Toppari J, Vähä-Mäkilä M, Ilonen J, Veijola R, Knip M, Hyöty H. Coxsackievirus B1 infections are associated with the initiation of insulin-driven autoimmunity that progresses to type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2018 ;61(5):1193-1202.

Smekens SP, Montag AG, Thomas G, Albiges-Rizo C, Carroll R, Benig M, Phillips LA, Martin S, Ohagi S, Gardner P. Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 ;89(18):8822-6.

So M, Elso CM, Tresoldi E, Pakusch M, Pathiraja V, Wentworth JM, Harrison LC, Krishnamurthy B, Thomas HE, Rodda C, Cameron FJ, McMahan J, Kay TWH, Mannering SI. Proinsulin C-peptide is an autoantigen in people with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 ;115(42):10732-10737.

Soedamah-Muthu SS, Vergouwe Y, Costacou T, Miller RG, Zgibor J, Chaturvedi N, Snell-Bergeon JK, Maahs DM, Rewers M, Forsblom C, Harjutsalo V, Groop PH, Fuller JH, Moons KG, Orchard TJ. Predicting major outcomes in type 1 diabetes: a model development and validation study. *Diabetologia.* 2014 ;57(11):2304-14.

Steenkamp Dw, Cacicedo Jm, Sahin-Efe A, Sullivan C, Sternthal E. Preserved proinsulin secretion in long-standing type 1 diabetes. *Endocr Pract.* 2017 ;23(12):1387-1393.

Stewart TA, Hultgren B, Huang X, Pitts-Meek S, Hully J, MacLachlan NJ. Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science.* 1993 ;260(5116):1942-6.

Tam PE, Messner RP. Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. *J Virol.* 1999 ;73(12):10113-21.

Thomas J, Perron H, Feschotte C. Variation in proviral content among human genomes mediated by LTR recombination. *Mob DNA.* 2018 ;9:36.

Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature.* 2010 ;464(7292):1149-54.

Tracy S, Smithee S, Alhazmi A, Chapman N. Coxsackievirus can persist in murine pancreas by deletion of 5' terminal genomic sequences. *J Med Virol.* 2015 ;87(2):240-7.

Tu X, Li S, Zhao L, Xiao R, Wang X, Zhu F. Human leukemia antigen-A*0201-restricted epitopes of human endogenous retrovirus W family envelope (HERV-W env) induce strong cytotoxic T lymphocyte responses. *Virol Sin.* 2017 ;32(4):280-289.

van Horssen J, van der Pol S, Nijland P, Amor S, Perron H. Human endogenous retrovirus W in brain lesions: Rationale for targeted therapy in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2016 ;8:11-8.

Vantghem MC, Kerr-Conte J, Arnalsteen L, Sergent G, Defrance F, Gmyr V, Declerck N, Raverdy V, Vandewalle B, Pigny P, Noel C, Pattou F. Primary graft function, metabolic control, and graft survival after islet transplantation. *Diabetes Care.* 2009 ;32(8):1473-8.

Vreugdenhil GR, Wijnands PG, Netea MG, van der Meer JW, Melchers WJ, Galama JM. Enterovirus-induced production of pro-inflammatory and T-helper cytokines by human leukocytes. *Cytokine*. 2000 ;12(12):1793-6.

Wang T, Yu B, Lin L, Zhai X, Han Y, Qin Y, Guo Z, Wu S, Zhong X, Wang Y, Tong L, Zhang F, Si X, Zhao W, Zhong Z. A functional nuclear localization sequence in the VP1 capsid protein of coxsackievirus B3. *Virology*. 2012 ;433(2):513-21..

Wasserfall C, Nick HS, Campbell-Thompson M, Beachy D, Haataja L, Kusmartseva I, Posgai A, Beery M, Rhodes C, Bonifacio E, Arvan P, Atkinson M. Persistence of Pancreatic Insulin mRNA Expression and Proinsulin Protein in Type 1 Diabetes Pancreata. *Cell Metab*. 2017 ;26(3):568-575.e3.

Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ*. 2011 ;342:d35.

Yin H, Berg AK, Westman J, Hellerström C, Frisk G. Complete nucleotide sequence of a Coxsackievirus B-4 strain capable of establishing persistent infection in human pancreatic islet cells: effects on insulin release, proinsulin synthesis, and cell morphology. *J Med Virol*. 2002 ;68(4):544-57.

Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg AM, Otonkoski T, Kandolf R, Hovi T, Roivainen M. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia*. 2004 ;47(2):225-39.

Yuan JP, Zhao W, Wang HT, Wu KY, Li T, Guo XK, Tong SQ. Coxsackievirus B3-induced apoptosis and caspase-3. *Cell Res*. 2003 ;13(3):203-9.