Infection à entérovirus in vitro et in vivo

Mehdi Ayech Benkahla

▶ **To cite this version:**

Mehdi Ayech Benkahla. Infection à entérovirus in vitro et in vivo. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S053 . tel-01956976v2

HAL Id: tel-01956976

https://theses.hal.science/tel-01956976v2

Submitted on 11 Jan 2019

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 II

Ecole Doctorale Biologie Santé

Pour l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Virologie

Infection à entérovirus *in vitro* et *in vivo*

Présentée et soutenue par :

Mehdi Ayech BENKAHLA

Le 16 Décembre 2016

Devant le jury composé de :

Pr. Sandrine CASTELAIN

Pr. Gilles DUVERLIE

Pr. Didier HOBER

Pr. Rachel DESAILLOUD

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaiterais adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Je remercie le **Pr Didier HOBER**, directeur du Laboratoire de Virologie EA3610 et Professeur à la Faculté de Médecine de Lille pour m'avoir accepté dans son laboratoire, les conseils prodigués, sa patience, le temps qu'il a bien voulu m'accorder. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie le **Pr. Rachel DESAILLOUD** qui a permis la réalisation de cette thèse.

Je remercie le programme **Erasmus Mundus projet Fatima Al Fihri** et le projet européen **PEVNET** qui ont financé ma thèse.

J'adresse mes remerciements au **Pr. Gilles DUVERLIE** ainsi qu'au **Pr. Sandrine CASTELAIN** pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens également à remercier Dr. Hela JAIDANE et Firas MASTOUR, pour les moments partagés ensembles, depuis le Master.

Je remercie aussi toutes les autres personnes du laboratoire de Virologie qui m'ont beaucoup aidé tout au long de cette thèse, en particulier : Famara, Pr. Romond, Delphine, Pierre Emmanuel, Kazali, Antoine, Angelo, Cédric, Anais et Magloire…

Finalement je tiens à remercier ma famille pour leur soutien sans faille et leurs encouragements. Merci d'avoir toujours été là et de m'avoir tant aidé.

Table des matières

RESUME 4

ABSTRACT 6

Liste des abréviations 8

INTRODUCTION 10

I. Coxsackievirus B 11

1. Morphologie et structure 12
2. Réplication et cycle viral 13

II. Diabète 16

1. Diabète de type 1 fulminant 17
2. Diabète de type 1 auto-immun 17

III. Modèles animaux de diabète de type 1 19

1. Modèles animaux de diabète spontané 19
1.1. La souris NOD (Non Obese Diabetic) 19
1.2. Le rat BBDP (Bio-Breeding Diabetes Prone) 19
2. Les modèles animaux de diabète induit chimiquement 19

IV. Entérovirus, coxsackievirus B4 et diabète de type 1 21

1. Approche expérimentale dans l'étude des mécanismes pathogéniques de l'infection à CV-B menant au diabète de type 1 22
1.1. CV-B et pancréas 23
1.2. Infection à coxsackievirus B4 dépendante d'anticorps 26

V. Immunité innée anti-Coxsackievirus B 27

1. Les monocytes - macrophages 28
2. Interféronγ induit par la protéine 10 (IP-10) 30
3. Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα) 32
4. Interféron gamma (IFNγ) 32

VI. Lutte anti-entérovirale 33

1. Vaccination 33
1. Traitements antiviraux 33
1.1. Le pleconaril 33
1.2. Pirodavir 35
1.3. Chlorure de guanidium 35
1.4. Hydantoïne 35
1.5. La fluoxétine 36

VII. Objectifs de l'étude 37

MATERIELS & METHODES 38

- **Virus** **39**
- **Sérum murin** **39**
- **Inoculation des souris avec le virus** **39**
- **Les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM).** **40**
- **Culture primaire des cellules totales de la rate.** **40**
- **Inoculation de cultures de cellules spléniques.** **40**
- **Isolement des populations CD14 et des F4/80 à partir de la rate de souris.** **41**
- **Cytométrie en flux et Tri cellulaire.** **41**
- **Streptozotocine** **42**
- **Cellules** **42**
- **Titrage du virus infectieux** **42**
- **Inoculation de streptozotocine et de virus et suivi des souris** **42**
- **Broyage des organes et extraction de l'ARN total** **43**
- **PCR en temps réel quantitative (qRT-PCR)** **43**
- **Quantification d'IP-10 de TNFα et d'IFNγ dans le broyat de pancréas par méthode ELISA** **44**

IP-10 44

TNFα 44

IFNγ 45

- **Quantification d'insuline sérique par méthode ELISA** **45**
- **Analyse histologique** **46**
- **Molécules de synthèse** **46**
- **Test de cytotoxicité** **46**
- **Test d'activité antivirale** **47**
- **Sérum de porcelet** **47**
- **Test de séroneutralisation** **47**
- **ELISA pour la détection d'anticorps anti-VP4 d'EV-G** **47**
- **Analyse des séquences protéiques** **48**
- **Alignement** **48**
- **Analyse statistique** **48**

RESULTATS **49**

I. Monocytes et macrophages cibles de CV-B4 E2 *in vitro* et *in vivo* **50**

1. CVB4 E2 est retrouvé dans la rate et les cellules de la moelle osseuse isolées de souris inoculées par le virus **50**

2. CV-B4 E2 infecte les cellules CD14+ et les cellules F4/80+ de la rate *in vitro* **53**

- **CV-B4 E2 infecte les cellules de la moelle osseuse *in vitro*** **58**

II. Modèle murin de diabète induit par CV-B4 E2 ..... **61**

1. Diabète induit par CV-B4E2 chez des souris traitées avec une dose sub-diabétogène de streptozotocine **61**

2. Impact de CV-B4E2 sur le pancréas de souris traitées avec une dose sub-diabétogéne de streptozotocine **66**

III. Lutte anti-entérovirale **78**

1. Etude de l'activité anti-CV-B4 E2 des dérivés du pirodavir et du pleconaril **79**

- **Favipiravir** **84**
- **Fluoxétine** **86**

IV. Infection naturelle à entérovirus chez des porcelets..... 90

1. L'exposition naturelle de porcelets aux entérovirus étudiée grâce à la détection d'anticorps anti-VP4 d'EV-G1.....90

***DISCUSSION*.....94**

I. Monocytes et macrophages cibles de CV-B4 E2 *in vitro* et *in vivo*.....95

II. Modèle murin de diabète induit par CV-B4 E2.....99

III. Lutte anti-entérovirale.....103

IV. Infection naturelle à entérovirus chez des porcelets.....104

***CONCLUSIONS & PERSPECTIVES*.....106**

BIBLIOGRAPHIE.....110

RESUME

Le genre Enterovirus comporte de nombreux virus à ARN non enveloppés regroupés en espèces EV-A-J et Rhinovirus A-C. Les coxsackievirus B (CV-B) appartiennent à l'espèce EV-B. Le rôle des CV-B et notamment de CV-B4 dans la pathogenèse du diabète de type 1 (DT1) est fortement suspecté. Coxsackievirus-B4 E2 (CV-B4 E2) isolé à partir du pancréas d'un patient souffrant de DT1 est capable d'induire une hyperglycémie chez des souris. Les mécanismes de la pathogenèse entérovirale du diabète ne sont pas encore bien connus. Il a été montré que les monocytes humains sont infectés par CV-B4 *in vitro* grâce à des anticorps anti-VP4 formant des complexes avec le virus, et que les macrophages humains également sont infectés par CV-B4 *in vitro*. Les études réalisées *in vitro* sont riches d'informations mais des modèles d'infection *in vivo* sont nécessaires pour explorer davantage les mécanismes des infections à entérovirus. Malgré l'impact des entérovirus en pathologie les moyens de lutte contre ces virus sont limités.

Nos principaux objectifs étaient i) d'étudier l'infection à CV-B4 E2 chez la souris et de déterminer si les monocytes/macrophages sont des cibles du virus *in vivo* ii) de mettre en oeuvre un modèle de diabète induit par CV-B4 E2 chez la souris iii) d'étudier l'activité anti-CV-B4 de diverses molécules *in vitro* iiii) de mettre en évidence la survenue d'infections entérovirales naturelles chez des animaux.

L'ARN viral est présent *in vivo* dans les monocytes (CD14+) et macrophages (F4/80+) de la rate et dans les cellules de la moelle osseuse de souris ICR-CD1 inoculées avec CV-B4 E2. *In vitro*, CV-B4 E2 infecte les cellules CD14+ et les cellules F4/80+ de la rate. Les macrophages dérivés de la moelle osseuse cultivés en présence de M-CSF sont infectés par CV-B4 *in vitro*. Le sérum de souris infectée par CV-B4 E2 facilite l'infection *in vitro* des cellules spléniques par CV-B4 E2, mais pas celle des macrophages dérivés de la moelle osseuse. Chez des souris ICR-CD1 préalablement traitées par des doses sub-diabétogènes de streptozotocine β (STZ), l'inoculation de CV-B4 E2 provoque une hyperglycémie associée à une hypo-insulinémie. La charge virale du pancréas évaluée par RT-PCR quantitative n'est pas différente chez les animaux diabétiques (STZ/CV-B4 E2) par rapport aux animaux inoculés avec le virus mais non diabétiques. L'analyse histologique du pancréas d'animaux diabétiques (STZ/CV-B4 E2) met en évidence des foyers d'inflammation au niveau des ilots de Langerhans. Des dérivés de pirodavir et de pléconaril, molécules qui se fixent à la capside des entérovirus, inhibent l'infection à echovirus 7 et 11 mais pas l'infection à CV-B4 E2 *in vitro*. Par contre la fluoxétine a fait preuve d'un effet anti-CV-B4

E2 dans un modèle de culture de fragments de pancréas et de cellules béta pancréatiques murins. La détection d'anticorps sériques anti-VP4 par ELISA, à l'aide d'un peptide de 50 acides-aminés de la protéine VP4 d'EV-G1 (un entérovirus porcin), a été appliquée à la mise en évidence de l'infection de jeunes porcs par des entérovirus. Une homologie de 88% de la séquence du peptide VP4 d'EV-G1 avec celle des protéines VP4 d' autres EV-G suggère que des anticorps dirigés contre ces virus distincts d'EV-G1 puissent être détectés.

En conclusion, CV-B4 E2 peut infecter les monocytes et les macrophages *in vitro* et *in vivo* dans un système murin, et le virus peut provoquer un diabète chez des souris préalablement exposées à de faibles doses de STZ. La fluoxétine inhibe l'infection à CV-B4 E2 de cellules pancréatiques *in vitro*. La détection d'anticorps anti-VP4 d'EV-G1 a permis de mettre en évidence des infections naturelles à entérovirus chez des jeunes porcs. Ce modèle porcin peut être mis à profit pour étudier la physiopathologie des infections à entérovirus et tester des moyens de lutte contre ces virus.

ABSTRACT

Enterovirus genus encompasses a number of non-enveloped RNA viruses grouped into 12 species, EV-A-J and Rhinovirus A-C. Group B coxsackieviruses (CV-B) belong to the EV-B species. CV-B and particularly CV-B4 are thought to be involved in the development of chronic diseases like type 1 diabetes (T1D). A strain of CV-B4 (CV-B4 E2) was isolated from the pancreas of a patient with T1D, and was able to induce a hyperglycemia in mouse. The mechanisms of the enteroviral pathogenesis of T1D are not well known yet. It has been observed that the infection of human monocytes with CV-B4 E2 *in vitro* can be enhanced by anti-VP4 antibodies bound to the virus, and human macrophages are also infected by CV-B4 *in vitro*. The *in vitro* studies are rich with information but *in vivo* infection models are needed to better understand the mechanisms of enterovirus infections. Despite the effect of enteroviruses on health, the available means to fight these viruses are limited.

Our main objectives were i) to investigate CV-B4 E2-infection in mice and to determine whether monocytes / macrophages are targets of the virus *in vivo* ii) to implement a CV-B4 E2-induced diabetes model in mice iii) to study the anti-CV-B4 E2 activity of various molecules *in vitro* iiii) To display the natural occurrence of enterovirus infection in animals.

Viral RNA was found *in vivo* in monocytes (CD14+) and macrophages (F4/80+) of the spleen and in bone marrow cells of ICR-CD1 mice inoculated with CV-B4 E2. *In vitro*, CV-B4 E2 infected the CD14+ and the F4/80+ cells of the spleen. Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were infected by CV-B4 *in vitro*. The serum of CV-B4 E2- infected mice enhanced *in vitro* the infection of spleen cells by CV-B4 E2 but not the infection of BMDM. ICR-CD1 mice, treated with a sub-diabetogenic dose of Streptozotocin β (STZ), and afterwards inoculated with CV-B4 E2 developped hyperglycaemia and hypoinsulinemia. The viral load of pancreas assessed by quantitative RT-PCR was not different in diabetic animals (STZ/CV-B4 E2) compared to non-diabetic animals inoculated with CV-B4 E2. Histological analysis of diabetic animals highlighted an inflammation of pancreas islets.

Pirodavir-derived molecules, which bind to enteroviruses capsid, inhibited the infection with echovirus 7 and 11 but not the infection with CV-B4 E2 *in vitro*. On the other hand, an anti-CV-B4 E2 effect of fluoxetine in cultures of mouse pancreas fragments and mouse beta cells was displayed. The detection of anti-VP4 antibodies in serum by ELISA based on a 50 amino acids

peptide of VP4 from EV-G1 (a porcine enterovirus) was used to display enterovirus infections in piglets. A strong sequence homology (88%) between the VP4 of EV-G1 and of other EV-G suggests that antibodies directed against viruses other than EV-G1 can be detected.

In conclusion, CV-B4 E2 can infect monocytes and macrophages *in vitro* and *in vivo* in a murine system, and the virus can cause diabetes in mice previously exposed to low doses of STZ. Fluoxetine inhibits the infection of pancreatic cells with CV-B4 E2 *in vitro*. The detection of anti-EV-G1 VP4 antibodies displayed natural enterovirus infections in young pigs. This porcine model can be used to study the pathophysiology of enterovirus infections and to evaluate approaches aimed to fight these viruses.

Liste des abréviations

AANE : Acide Aminé Non-Essentiel

ADE: Antibody Dependent Enhancement

ADN: Acide Désoxyribonucleïque

ARN : Acide RiboNucléïque

ATP: Adenosine Tri-Phosphate

BBDP: Bio-Breading Diabetes Prone

BMDM : Bone-Marrow Derived Macrophages

CAR : Coxsackievirus Adenovirus Receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CV-B : Coxsackievirus B

DAF : Decay Accelarating Factor

DC: Dendritic Cells

DT-1 : Diabète de Type 1

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EV-B : Entérovirus B

FcγR: Fcγ Recepteur

GADA : Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies

HEV : Human Enterovirus

HLA : Human Leucocyte Antigen

IAA : Insulin Auto-antibodies

ICA : Islet Cell Antibodies

ICAM-1 : IntraCellular Adhesion Molecule-1

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

IDDM: Insulino-dependent diabetes Mellitus

IFN: Interféron

IgG: Immunoglobuline G

IL: Interleukine

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

IP-10: Interferon gamma-induced protein 10

IRES: Internal ribosome entry site

IRF: Interferon Regulatory Factor

LADA : Diabètes Autoimmun Latent chez les Adultes

LT: Lymphocytes T

MAF: Facteur Activateur des Macrophages

MCSF: Macrophage Colony Stimulating Factor

MDM: Monocyte Derives Macrophages

Myd 88: Myeloid differentiation primary response gene 88

NAD: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NF-Kβ: nuclear factor-kappa B

NIDDM: Non Insulino-dependent diabetes Mellitus

NLR: Nod-Like Recpetors

NOD: Non-Obese Diabetic

ORF : Open Reading Frame

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS : Phophate Buffer Saline

PRR: Pattern Recognition Receptors

PV: Poliovirus

PVR: Polyovirus receptor

RLR: RIG-I Like Recpetors

STZ: Streptozotocine

Th1: T Helper 1

TLR: Toll-Like Receptors

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRIF: Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter inducing interferon

VP1-4 : Protéine virale 1-4

VPg : Protéine virale g

INTRODUCTION

I. Coxsackievirus B

Les Coxsackievirus du groupe B (CV-B) appartiennent à l'espèce Entérovirus B (EV-B), du genre *Enterovirus* de la famille des *Picornaviridae*. Les CV-B regroupent 6 sérotypes, CV-B1 à 6, des virus ubiquitaires connus depuis plus d'une cinquantaine d'années. Ce sont des agents causant diverses maladies humaines généralement aiguës dont certaines bégnines (asymptomatiques) et d'autres plus graves telles que les pancréatites, myocardites, méningites aseptiques, ainsi que des maladies chroniques telles que la cardiomyopathie dilatée et seraient impliqués dans le développement du diabète de type 1 (DT1) (Hober D. & Sauter P. 2010 ; Hober D. et *al.,* 2012 ; Tapparel C. et *al.,* 2013).

Le genre *Enterovirus* contenait auparavant 5 espèces, Entérovirus Humains (HEV) A à D et les Poliovirus (PV). Le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) a répertorié au moins 316 sérotypes répartis dans 12 espèces. L'espèce *Poliovirus* n'existe plus et les PV ont été intégrés dans l'espèce EV-C (King et *al.,* 2012).

Tableau 1: Classification des Entérovirus.

Genus	Espèce	Sérotypes
Enterovirus	***Enterovirus A***	CV-A, EV-A, SV et BA13
	Enterovirus B	CV-B, CV-A9, EV-B et SA5
	Enterovirus C	PV, CV-A, EV-C
	Enterovirus D	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111, EV-D120
	Enterovirus E	EV-E 1-4
	Enterovirus F	EV-F 1-6
	Enterovirus G	EV-G 1-16
	Enterovirus H	EV-H1
	Enterovirus J	SV6, EV-J103, EV-J108, EV-J112, EV-J115 et EV-J121
	Rhinovirus A	RV-A (80 sérotypes)
	Rhinovirus B	RV-B (32 sérotypes)
	Rhinovirus C	RV-C (55 sérotypes)

1. Morphologie et structure

Les CV-B, comme tous les *Picornaviridae,* sont de petits virus sphériques (environ 30 nm de diamètre), non enveloppés, à symétrie cubique (capside icosaédrique) et à ARN positif, monocaténaire, linéaire et non segmenté (Pallansh et al., 2007 ; Oberst M.S. 2008).

Les CV-B ont pour génome une molécule d'ARN simple brin, positive. L'ARN viral est infectieux car dès l'entrée dans la cellule, il est traduit pour produire les protéines virales nécessaires à la réplication virale. Le génome viral est de petite taille, approximativement 7500 nt (7396 pour CV-B4 E2) contenant un seul ORF (*Open Reading Frame*) flanqué de deux régions non codantes en 5' et en 3' (*voir* figure 1). A la partie 5' est associée une protéine, la VPg (protéine virale génomique) et à la partie 3' une queue polyA. La région non codante 5' est impliquée dans la synthèse protéique et la partie 3' est impliquée dans la synthèse du brin d'ARN négatif.

L'ORF est divisé en 3 régions : P1, P2 et P3. Sa traduction aboutit à une polyprotéine d'environ 2200 aa. La région P1 code pour les protéines structurales du virion, tandis que les autres protéines fonctionnelles (réplication, interactions hôtes-cellules, etc.) sont codées par les régions P2 et P3. Après une succession d'autoclivages (par des protéases virales), on aboutit à 11 protéines matures, 7 protéines non structurales et 4 protéines structurales VP1-VP4 répétées 60 fois constituant la capside icosaédrique du virus (Marjomäki V. et al., 2015) (*voir* figure 1).

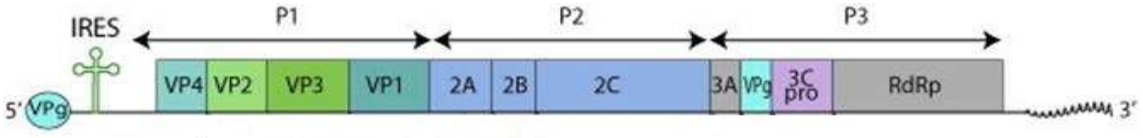

Figure 1: Génome des entérovirus et produits de la polyprotéine. (D'après Swiss Institute of Bioinformatics).

La diffraction des rayons X a montré que les protéines VP1, VP2 et VP3 se situent à l'extérieur de la capside tandis que la VP4 se situe à l'intérieur de la capside, en contact étroit avec le génome viral (Muckelbauer et *al.,* 1995) (*voir* figure 2). Le site de fixation au récepteur se situe sur la VP1, c'est une dépression appelée canyon (Rossman et *al.,* 2002).

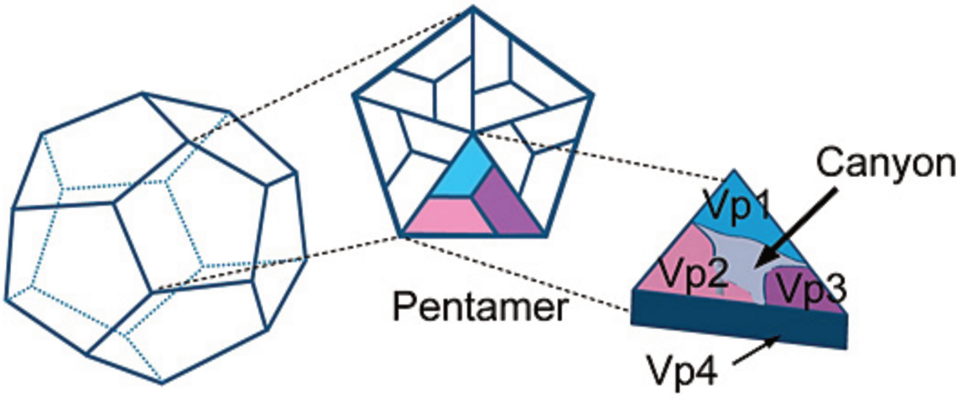

Figure 2: Structure de la capside et localisation du canyon (Gonzalez-Mariscal et *al*., 2009)

La capside est formée par les 4 protéines virales, VP1, VP2, VP3 et VP4. Ces quatre molécules VP1, VP2, VP3 et VP4 forment un protomère, 5 protomères forment un pentamère et 12 pentamères composent la capside.

2. Réplication et cycle viral

Les différentes étapes du cycle des CV-B sont illustrées par la Figure 3.

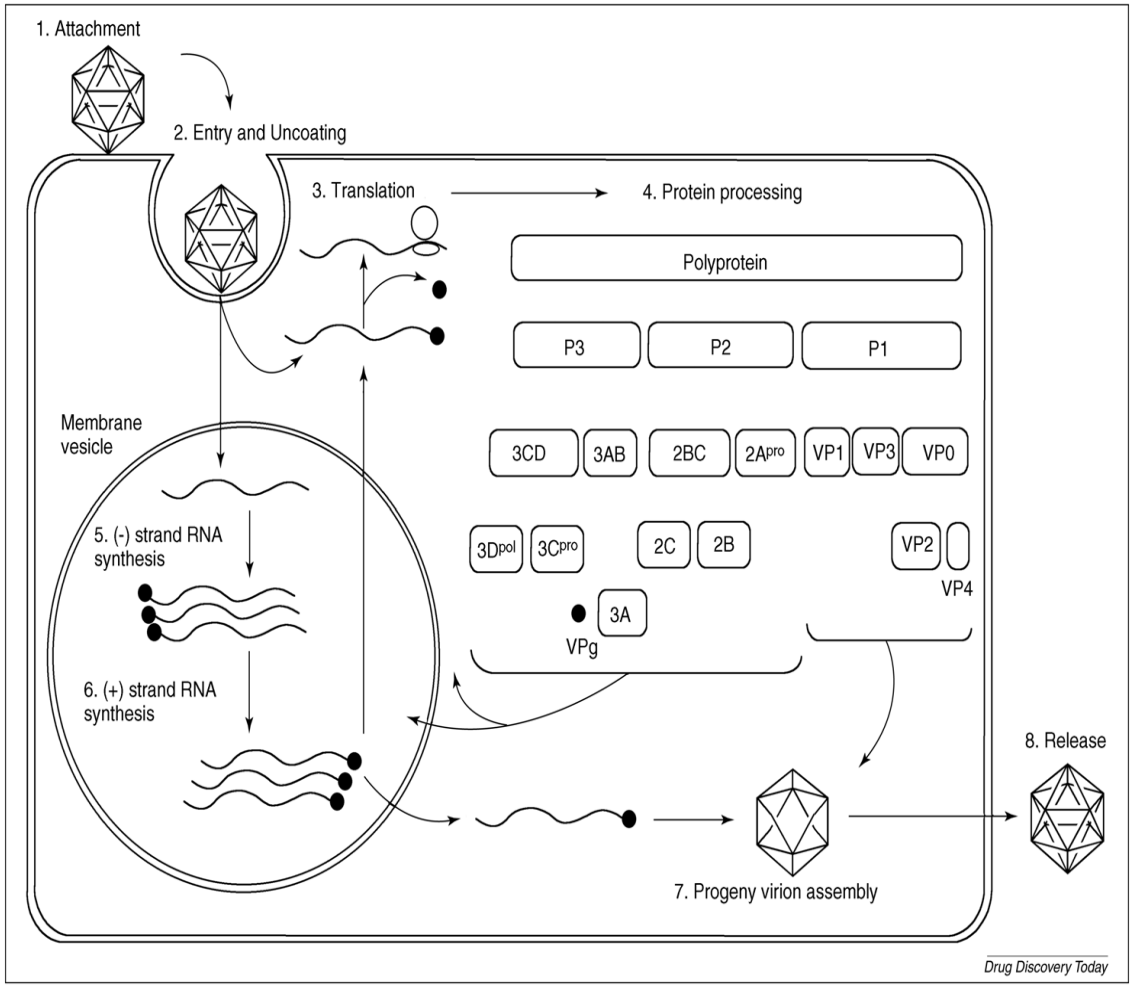

Figure 3: Cycle de réplication d'un entérovirus (Wu et *al*., 2010)

La première étape du cycle viral est l'adsorption du virus à sa cellule hôte. Pour ce faire**,** le virus a besoin d'un récepteur, molécule se trouvant naturellement à la surface de la cellule hôte et à laquelle le virus a su s'adapter pour s'introduire à l'intérieur.

Ce sont les récepteurs qui déterminent le tropisme viral. Sept récepteurs fixant les entérovirus ont été identifiés chez les êtres humains : le récepteur des PV (PVR ou CD155), trois intégrines (α2β1, αvβ3 et αvβ6), *Decay-Accelerating Factor* (DAF ou CD55), la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1) et CAR (*Coxsackievirus-Adenovirus Receptor*) utilisé par les CV-B 1 à 6 (Hafenstein et *al.,* 2007).

CAR est un récepteur commun aux CVB 1-6 et aux adénovirus 2 et 5**.** Il est composé de 3 régions (Figure 4): une partie extracellulaire (216 aa) composée de deux boucles, une boucle D1 (région variable) et une autre D2 (région constante), une partie transmembranaire (23 aa) et une partie cytoplasmique (107 aa) (Freimuth et *al.,* 2008).

L'interaction cellule-virus se fait entre le récepteur CAR et son site de fixation, le canyon, sur la protéine VP1 (Figure 4). Cette interaction aboutit à l'entrée du virus par

endocytose, suivie de la décapsidation, résultat d'une série de changements de conformation de la capside, qui se solde par une injection du génome viral dans le cytoplasme (Freimuth et *al.,* 2008).

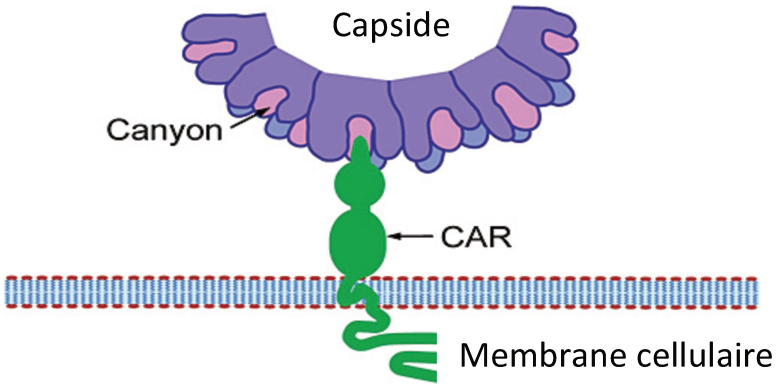

Figure 4: Interaction CAR-canyon (Gonzalez-Mariscal et *al*., 2009)

Le génome est un ARN de polarité positive directement traduit par les ribosomes de la cellule hôte qui se fixent au niveau de l'IRES à l'extrémité 5' NC, et ceci après clivage de la VPg par une protéase d'origine cellulaire. La traduction aboutit à une polyprotéine de 247 kDa qui subit des clivages successifs par les protéases virales pour donner les différentes protéines matures (Figures 1 et 3) (Wu et *al.,* 2010).

La réplication du génome viral se déroule dans le cytoplasme à la surface de complexes membranaires de réplication, et est assurée par l'ARN-polymérase ARN dépendante (3D) avec l'aide des autres protéines qui participent au complexe de réplication (2B, 2C, 3A, 3B, 3C et des précurseurs comme 3AB ou 3CD). La réplication se fait en deux étapes : la synthèse d'ARN- à partir de la matrice d'ARN+, puis la synthèse de plusieurs brins d'ARN+ à partir de chaque matrice d'ARN- (Figures 3 et 5) (Lin et *al.,* 2009).

Les molécules d'ARN synthétisées sont alors encapsidées et le virus est libéré par lyse de la cellule infectée.

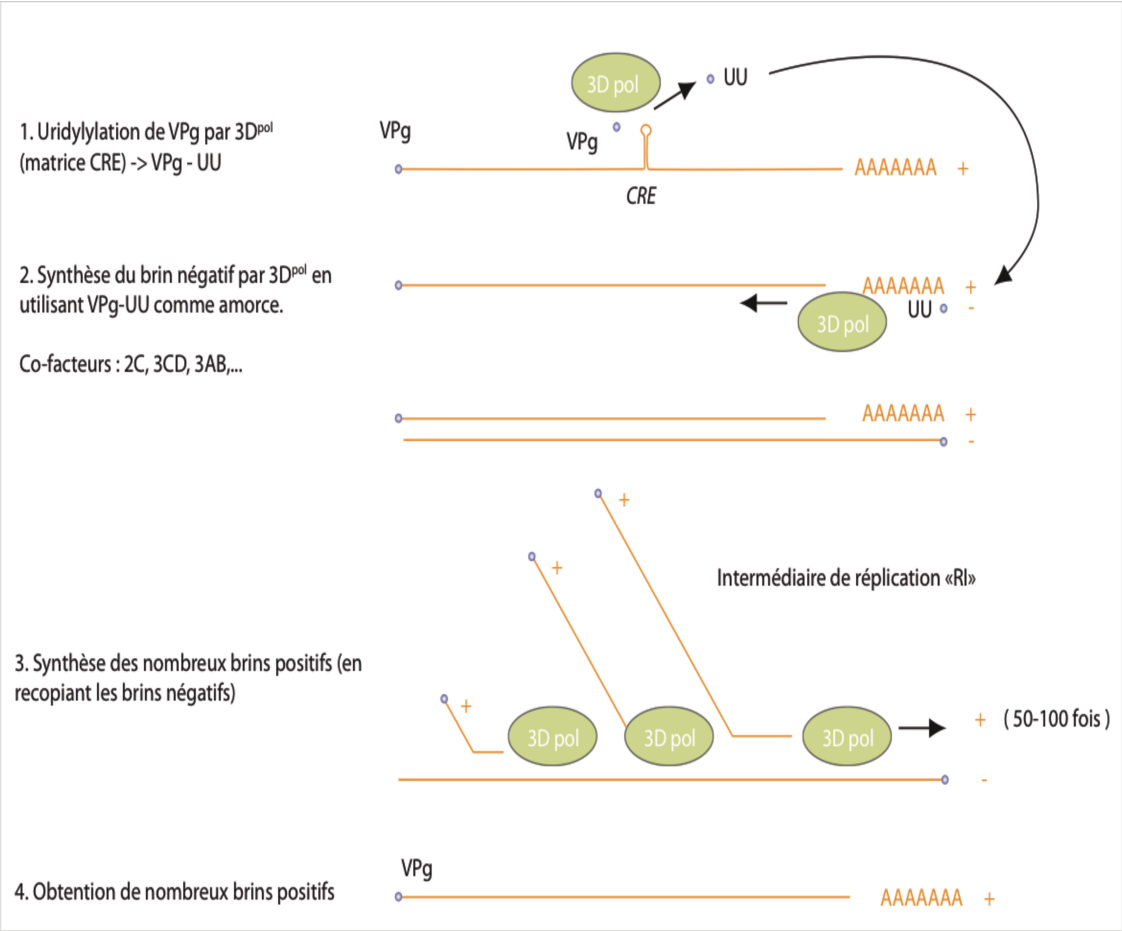

Figure 5: Réplication du génome des entérovirus (Cours de Virologie de l'Université catholique de Louvain http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=picorna)

II. Diabète

Le terme diabète du grec ancien *diabaino* qui signifie « passer à travers » a été utilisé pour décrire l'état d'une personne qui urine beaucoup. Quelque temps après, deux médecins indiens avaient notés que ces personnes avaient une urine qui attirait beaucoup les fourmis et les mouches. Au 17ème siècle à Liverpool (Angleterre), Matthew Dobson publia une série d'expériences montrant que le sérum des patients diabétiques ainsi que leurs urines contenaient une substance à goût sucré (Ekoé et *al.,* 2008).

En 1980, l'Organisation Mondiale de la Santé a défini l'état diabétique comme étant un état d'hyperglycémie (haute concentration du glucose sanguin) chronique en cause des facteurs environnementaux et génétiques. L'hyperglycémie est due à un défaut de sécrétion ou d'action de l'insuline, ou bien des deux. Ce déséquilibre peut engendrer des perturbations dans le métabolisme des hydrates de carbone, des lipides et des protéines.

Le diabète sucré présente plusieurs symptômes : polyurie, polydipsie, troubles de la vision, perte de poids malgré la polyphagie et dans les cas les plus sévères, acidocétose ou bien un état hyperosmolaire non cétonique qui peut engendrer coma et mort. Le diabète est la cause de plusieurs complications parmi lesquelles, athérosclérose, néphropathie, rétinopathie, neuropathie, dysfonction sexuelle et risque de maladie cardiovasculaire et cérébrovasculaire (Ekoé et *al.,* 2008).

Il y a deux grandes classes de diabète appelées diabète insulino-dépendant (IDDM) ou DT1 et diabète non insulino-dépendant (NIDDM) ou DT2. Il existe une troisième classe de diabète spécifique.

L'IDDM ou DT1 est caractérisé par une altération de fonction ou une destruction des cellules β qui finit par causer une déficience en insuline. Il y a deux types de DT1 :

1. Diabète de type 1 fulminant

Ce type de diabète n'a aucune cause connue, et touche généralement les personnes d'origine africaine et asiatique (Ekoé et *al.,* 2008). C'est une maladie extrêmement agressive caractérisé par une soudaine apparition d'une hyperglycémie, une acidocétose et la destruction totale des cellules β (Imagawa et al., 2000). Le diabète de type 1 fulminant (DT1F) est caractérisé par l'absence d'auto-anticorps mais une étude menée au Japon a montré que 5% des patients avec un DT1F avaient des anticorps anti-GAD (glutamate acide décarboxylase) (Imagawa et al., 2003). Il a été montré que l'IP-10 sécrété par les cellules β active et attire dans les ilots des cellules T autoréactives et des macrophages via le CXCR3 (C-X-C chemokine receptor 3), Les macrophages et les cellules T autoréactives sécrètent des cytokines inflammatoires activant l'autoimmunité et accélérant la destruction des cellules β (Tanaka et al., 2009).

2. Diabète de type 1 auto-immun

Le DT1 auto-immun est la conséquence d'une destruction auto-immune des cellules β du pancréas médiée par les lymphocytes T cytotoxiques. Le taux de destruction est assez variable, il peut être rapide chez les enfants et avec une progression assez lente chez les adultes, tel qu'elle s'observe au cours du diabète auto-immun latent chez les adultes (LADA) (Brahmkshatriya et *al.,* 2012). Au cours de cette destruction, des auto-Acs sont produits contre des antigènes pancréatiques. Ces Acs sont essentiellement dirigés contre les ilots (*islet cell antibodies,* ICA), la glutamate décarboxylase (*glutamic acid decarboxylase antibodies*, GADA), l'insuline (*insulin autoantibodies,* IAA) et la phosphatase membranaire des cellules

β, IA2 (IA2A) (Verge et *al.,* 1996). La réaction auto-immune se développe pendant plusieurs années. Lorsque 80 à 90% des cellules β sont détruites, la glycémie augmente et les symptômes apparaissent. Cette destruction peut être déclenchée par des facteurs environnementaux si le terrain génétique est favorable**.**

En effet, il existe une susceptibilité multigénique au DT1 avec au moins 10 gènes en cause. Le locus le plus important dans la susceptibilité au DT1 est celui du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui code pour les glycoprotéines HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe I et II avec un risque de 3 à 5% de développer la maladie chez les sujets avec l'allèle HLA-DR3 ou DR4 (classe II). Ce risque atteint 20 à 40% chez les individus DR3 et DR4. D'autres allèles sont aussi associés à un risque plus élevé d'avoir la maladie, *DQA1*03-DQB1*0302* et *DQA1*05-DQB1*0201* (Chan et *al.,* 2008). Un deuxième gène de susceptibilité est celui de l'insuline, la présence de l'allèle VNTR-INS augmente le risque de DT1 (*revu par* Jaïdane & Hober, 2008).

L'âge moyen d'apparition du DT1 se situe entre 8 et 16 ans avec un pic autour de la puberté (10-15 ans). Il touche autant les mâles que les femelles mais avec une légère prédominance masculine.

Il existe une grande variation géographique de l'incidence du DT1. En Europe par exemple, elle est de 3,2 nouveaux cas/100000 habitants/an en Macédoine contre 41 nouveaux cas/100000 habitants/an en Finlande. Un gradient Nord-Sud a été décrit ; la Sardaigne fait l'exception car elle présente une incidence proche de celles des pays scandinaves (Karvonen et *al.,* 2000).

Le diabète de type 1 est la conséquence de la destruction des cellules β due à un stress métabolique ou à une infection virale. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA), particulièrement les cellules dendritiques et les macrophages ont pour rôle d'éliminer les corps apoptotiques par phagocytose. L'apoptose n'est pas immunogène mais l'inefficacité des cellules immunitaires à éliminer les corps apoptotiques ou une infection virale induit le développement d'un environnement inflammatoire dans les ilots de Langerhans qui activerait les CPA. Après migration vers les ganglions lymphatiques du pancréas et la rate, les CPA présentent les antigènes des ilots aux cellules T autoréactives et les activent. Les cellules T autoréactives vont par la suite infiltrer les ilots et détruire les cellules β induisant le DT1 (Hanafusa & Imagawa, 2008).

Une grande partie des connaissances sur le DT1 provient de modèles animaux, car les tissus pancréatiques humains ne sont pas facilement accessibles.

III. Modèles animaux de diabète de type 1

Face aux difficultés d'étudier le DT1 chez les humains, les chercheurs ont développé des modèles animaux de diabète plus particulièrement chez la souris et le rat, animaux dont la physiologie est proche de celle de l'Homme, faciles à élever et à entretenir**,** avec un coût relativement faible.

Des modèles animaux de diabète spontané et induit par différents moyens : chimiques, génétiques et immunologiques (*revu par* Jaïdane et *al.,* 2009).

1. Modèles animaux de diabète spontané

1.1. La souris NOD (Non Obese Diabetic)

La souris NOD est issue d'une lignée consanguine, c'est le modèle de DT1 le plus étudié jusqu'à présent. A l'âge de 5-7 semaines toutes les souris présentent une insulite (infiltration lymphocytaire dans les îlots pancréatiques) généralement suivie par l'apparition d'auto-Acs**,** puis à l'âge de 30 semaines, le développement spontané d'un DT1 chez 70% des femelles et 40% des mâles est observé (Bresson & von Herrath, 2011). Une fois le diabète installé, les conséquences pathologiques chez la souris NOD sont semblables à celles observées chez l'Homme.

1.2. Le rat BBDP (Bio-Breeding Diabetes Prone)

C'est le premier modèle animal de DT1 spontané, issu d'une lignée non consanguine de rats Wistar du Canada. La maladie est plus sévère chez les rats BBDP que chez les souris NOD. En effet, 2 à 4 semaines après l'insulite**,** plus de 90% des animaux, qu'ils soient mâles ou femelles, développent un diabète (Etuk, 2010).

2. Les modèles animaux de diabète induit chimiquement

Pour induire le diabète chez les animaux, les expérimentateurs utilisent des produits chimiques toxiques pour la cellule β, par exemple l'alloxane, dont la toxicité est due à la production de radicaux libres de l'oxygène.

La streptozotocine (STZ) est un dérivé monofonctionnel de la nitrosourée, isolé la première fois à partir de la bactérie *Streptomyces achromogenes*. Elle peut aussi être synthétisée chimiquement selon trois procédures différentes à partir : 1) du tétra-O-acétyle glucosamine hydrochloride, 2) de D-glucosamine + N-nitrosométhylecarbamyle-azide 3) de D-glucosamine N-méthyle-urée (Bolzàn & Bianchi, 2002). Sa structure moléculaire**,** décrite

par Herr et *al.,* (1967), est montrée dans la figure 6. Il s'agit d'une molécule de 2-déoxy-D-glucose substituée par un groupe N-méthyle-N-nitroso-urée au niveau du carbone C_2.

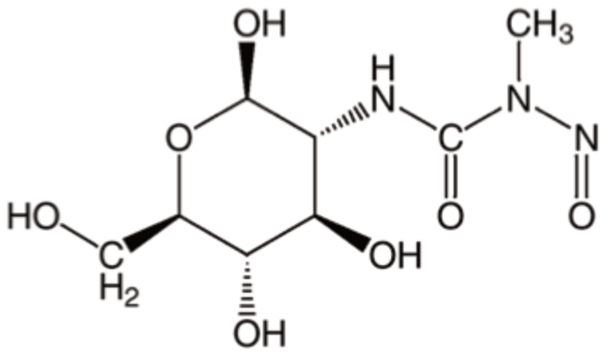

Figure 6: Structure de la Streptozotocine (Herr et *al.,* 1967)

La STZ agit en détruisant spécifiquement les cellules β des ilots de Langerhans. La toxicité sélective vis-à-vis des cellules β pancréatiques est liée à la fraction glucose dans sa structure chimique qui permet à la STZ d'entrer dans la cellule β via le transporteur de glucose 2 à faible affinité car les cellules β sont plus actives que les autres cellules pour incorporer du glucose et sont donc plus sensibles à la STZ (Elsner et al., 2000). Les cellules productrices d'insuline qui n'expriment pas le Glut2 sont résistantes à la toxicité de la STZ (Elsner et al., 2000). Une fois à l'intérieur, elle est rapidement métabolisée et agit particulièrement sur la mitochondrie et sur l'ADN. Dans la mitochondrie**,** la STZ agit en inhibant la production d'ATP et ainsi par la même occasion celle du NAD (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) (Okamoto & Takasawa, 2003). Par ailleurs, la STZ se lie à l'ADN pour former des dimères (*DNA adducts*), activant le processus de réparation de l'ADN qui utilise une poly(ADP-ribose) polymérase convertissant le NAD en ADP-ribose (Junod et *al.,* 1969). Étant donné que la production de NAD est perturbée, l'enzyme ne peut assurer sa fonction, ce qui conduit à la mort des cellules insulino-sécrétrices par apoptose ou nécrose ce qui participe au développement du diabète (figure 7).

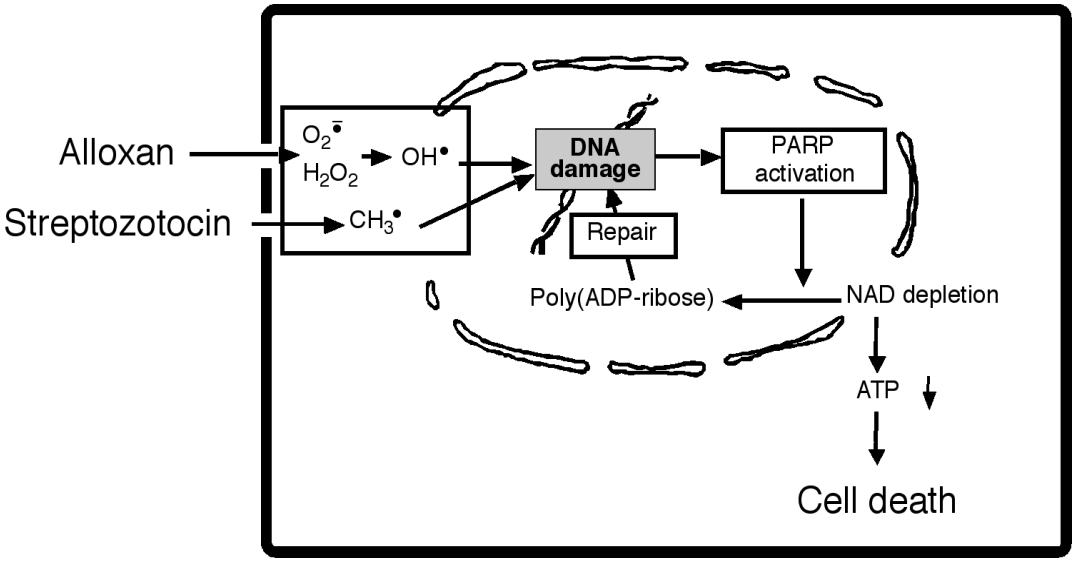

Figure 7: Mécanisme d'action des agents diabétogènes, la streptozotocine et l'alloxane
(Okamoto & Takasawa, 2003)

IV. Entérovirus, coxsackievirus B4 et diabète de type 1

Durant ces dernières années**,** l'incidence du DT1 n'a cessé d'augmenter de façon impressionnante. La composante génétique est certes importante dans le développement du DT1, mais ne peut expliquer une augmentation annuelle de l'incidence de l'ordre de 3 à 5% touchant spécifiquement les jeunes enfants âgés de moins de cinq ans. Cette augmentation est trop rapide pour n'être expliquée que par la composante génétique. De plus, il a été noté que seulement 5% des sujets génétiquement prédisposés développent la maladie. Par ailleurs, la concordance est seulement de 30 à 50% chez les jumeaux monozygotiques. Nous pouvons en déduire que la composante environnementale joue un rôle crucial dans l'étiologie du DT1 chez les personnes génétiquement prédisposées (*revu par* Jaïdane et *al.,* 2008b) .

Ces facteurs environnementaux peuvent être des drogues, des toxines ou bien des agents infectieux tels que les virus : rotavirus, adénovirus, rétrovirus, cytomégalovirus, virus Epstein-Barr, virus ourléen, virus de la rubéole, et surtout les entérovirus (Knip, 2003). L'hypothèse de l'implication des virus est confortée par le fait que l'incidence du DT1 est variable d'un pays à l'autre et au fil des saisons.

Gamble et *al.,* (1969) ont été les premiers à découvrir une possible relation entre le DT1 et les infections à coxsackievirus B. Ils ont montré que des anticorps anti-coxsackievirus B sont plus fréquents chez les patients atteints de DT1 que chez les contrôles. Peu de temps après, en 1979, Yoon et *al.,* ont isolé un virus à partir du pancréas d'un jeune garçon de dix

ans mort de céto-acidose diabétique. La neutralisation de ce virus par un antisérum dirigé contre un variant diabétogène dérivé de la souche prototype CV-B4 Van Barscholten (CV-B4 JVB), adaptée à la souris par passages successifs sur cellules β, suggérait que cet isolat humain était un CV-B4. En fait cet isolat était apparenté à la souche CV-B4 E2, l'un des trois variants E1, E2 et E3, purifiés par Hartig et *al.,* (1983). Ces variants ont été obtenus par clonages successifs de la souche Edwards isolée en 1956 par Kibrick et Benirschke (1958) du tissu myocardique d'un nouveau-né décédé suite à une infection généralisée (encéphalomyocardite) avec nécrose focalisée et inflammation du pancréas. Cet isolat inoculé à des souris susceptibles, telles que les souris SJL/J, induit une hyperglycémie avec inflammation au niveau des îlots de Langerhans et nécrose des cellules β. Il en est de même pour un isolat de CV-B5 également isolé d'un patient avec un diabète récent (Ramsingh et al., 1997 ; Yoon et al., 1986).

L'incidence du diabète n'a cessé d'augmenter ces dernières années dans les pays industrialisés. En plus du gradient nord-sud il faut rajouter le gradient riche-pauvre. En effet, les pays les plus riches et les plus développés présentent la plus forte incidence de DT1 (Van Belle et *al.,* 2011). La différence entre ces pays dits « riches » et ceux dits « pauvres » est le niveau d'hygiène et le contrôle des infections, grâce à la propreté des cités, le système gérant les égouts, la multitude d'hôpitaux et les campagnes de vaccination**.**

Les pays développés jouissent d'un milieu plus sain appauvri en agents pathogènes d'où la diminution des infections bactériennes et virales. Les habitants de ces pays sont ainsi moins exposés aux pathogènes, l'âge de la primo-infection est plus avancé, et les enfants ne sont donc plus protégés par les anticorps de leurs mères ce qui augmente le risque de complications de ces infections, telle que la destruction des cellules β (Viskari et *al.,* 2000).

A l'inverse, dans les pays moins développés où les infections sont plus fréquentes et surviennent à un âge beaucoup plus précoce, les enfants sont encore protégés par les anticorps à haut titre de leurs mères et dirigés contre divers sérotypes. Ainsi, les enfants dans ce contexte, ne risquent généralement qu'une infection localisée sans autres complications (Viskari et *al.,* 2000).

1. Approche expérimentale dans l'étude des mécanismes pathogéniques de l'infection à CV-B menant au diabète de type 1

1.1. CV-B et pancréas

La souche diabétogène CV-B4 E2 et la souche CV-B4 VD2921 ainsi que les souches prototypes des sérotypes CV-B2, B3, B4 et B5 sont capables d'infecter les cellules β *in vitro* (Ylipaasto et *al.,* 2004). Les CVB semblent avoir un tropisme pour le pancréas et plus particulièrement pour les cellules β. En effet, CV-B4 est capable d'infecter et de se répliquer dans les ilots de pancréas humains *in vitro* (Frisk & diderholm, 2000). Une autre étude a montré que CV-B4 est capable d'infecter les cellules β chez les patients avec un DT1 et que cette infection est associée à une inflammation et une altération des fonctions des cellules β (Dotta et al., 2007).

L'infection persistante *in vitro* d'ilots pancréatiques humains par CV-B4 active l'expression de l'IFNα par les cellules β ce qui augmenterait l'activité auto-immune dirigée contre ces cellules (Chehadeh et *al.,* 2000a). D'après Ylipaasto et al., (2004), les cytokines (IL1-β et l'IFNγ) induites par l'infection à CV-B5 augmentent l'expression de diverses chemokines, notamment Il-15, ce qui peut contribuer à l'activation des cellules mononuclées dans les ilots durant l'infection et ainsi participer à la réponse auto-immune précoce.

Divers mécanismes peuvent être impliqués dans la destruction des cellules β (Figure 8) :

Infection de la cellule β

La perte des cellules β et le déclenchement de l'insulite après une infection virale peut être due à plusieurs mécanismes. Lors de la phase aigue de l'infection, la destruction des cellules infectées peut être provoquée par la réplication virale et une réponse immune excessive. Cette destruction cellulaire est particulièrement délétère à cause de la capacité de prolifération limitée des cellules β (Cnop et al., 2010) (Figure 8A)

Destruction auto-immune de la cellule β par mimétisme moléculaire

L'hypothèse du mimétisme moléculaire, c'est la réactivité croisée entre un antigène virale et des protéines des ilots de Langerhans. La réponse immune dirigée contre l'antigène peut induire une réactivité croisée des lymphocytes T contre les auto-antigènes (Hiemstra et al., 2001). Dans le contexte des infections virales répétées dans un modèle de souris transgénique qui exprime un antigène viral dans les cellules β pancréatiques et le thymus, la réactivité croisée entre les épitopes viraux et des antigènes du soi peut augmenter la maladie auto-immune mais pas l'initier (Christen et al., 2004) (Figure 8B). L'hypothèse selon laquelle une homologie de séquence protéique entre la protéine virale 2C et la GAD 65 du pancréas a

un rôle dans la pathogenèse du DT1 a été remise en question (Schoolt et al., 2001). Le rôle d'homologies de conformation entre la protéine de capside VP1 et le précurseur de protéine de capside VP0 avec la tyrosine phosphatase IAR/IA-2 et la protéine de choc thermique 60 (HSP-60) a été suggéré (Harkonen et al., 2003).

« Bystander activation »

L'infection induit une inflammation du pancréas endocrine avec production de radicaux libres (oxyde nitrique) et cytokines provoquant la destruction des cellules β (Haverkos et al., 2003). « Bystander activiation » est caractérisé par l'activation des cellules T qui n'implique pas une reconnaissance spécifique d'un peptide présenté au récepteur des cellules T. Lors de l'infection des cellules adjacentes aux cellules β, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules dendritiques et les macrophages peut initier une « bystander activation » parmi les cellules T naïves dans le pancréas ou dans les ganglions lymphatiques et accélérer ainsi la destruction des cellules β (Horwitz et al., 1998 ; Pane et al., 2015) (Figure 8C).

Persistance de l'infection pouvant entrainer la destruction des cellules β

CV-B induit une réponse inflammatoire dans les cellules endocrines pancréatiques. L'inflammation locale pourrait conduire à une présentation de l'antigène des cellules β qui est renforcée par l'hyperexpression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH) par les cellules endocrines (Alidjinou et al., 2014). Le résultat de cette présentation antigénique est une destruction de cellules β par des lymphocytes T cytotoxiques.

La réinfection par le même virus ou bien un sérotype proche conduit à l'activation des LT_c et la destruction auto-immune des cellules β (Hyöty, 2002).

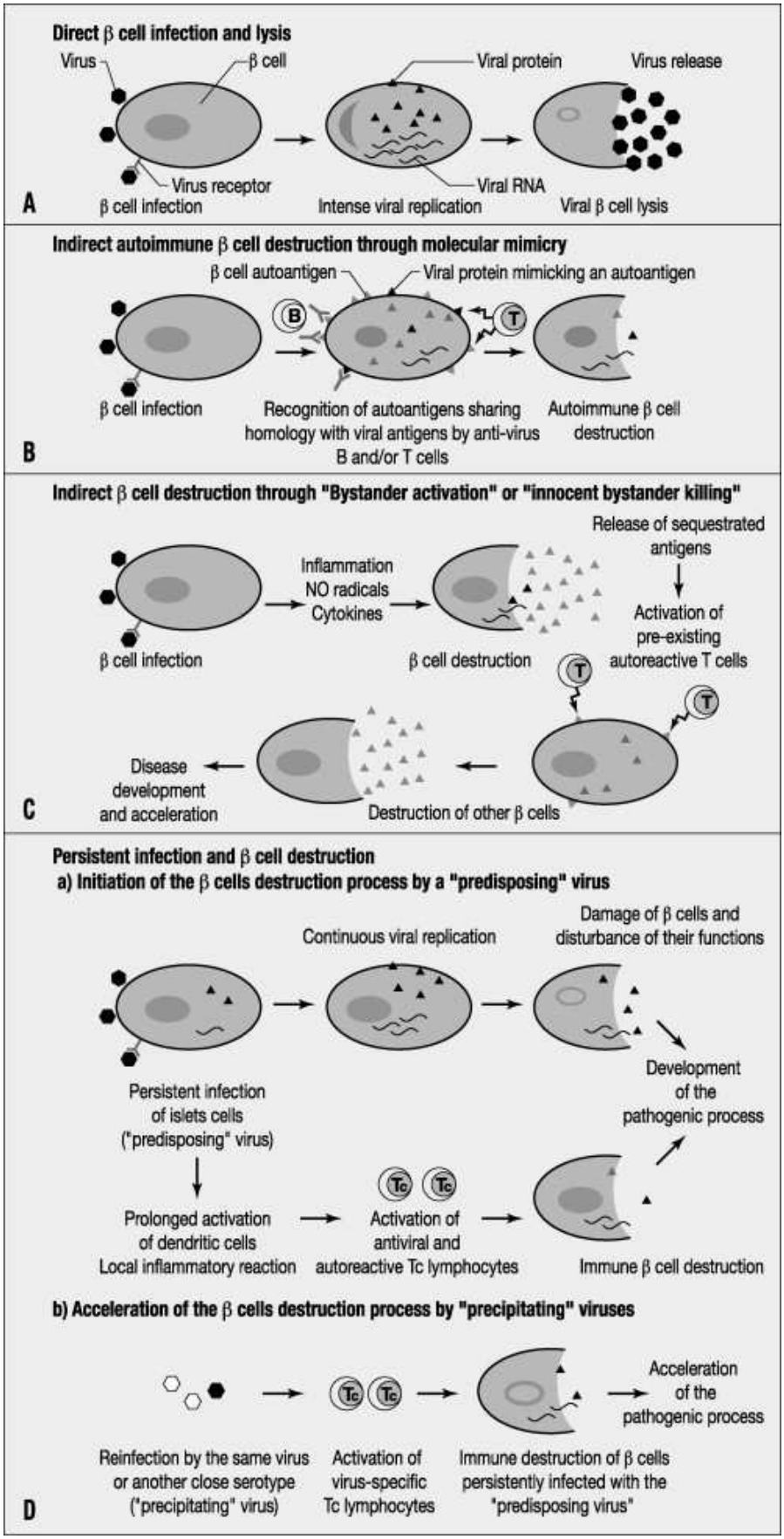

Figure 8: Représentation schématique des différents mécanismes de la destruction des cellules β. (Jaïdane & Hober, 2008)

1.2. Infection à coxsackievirus B4 dépendante d'anticorps

Tous les virus infectent les cellules en s'y attachant via l'interaction protéines de surface virales et récepteur/corécepteur spécifique. Les anticorps neutralisants spécifiques de ces protéines de surface du virus inhibent cette étape du cycle viral. En revanche, dans certaines conditions les anticorps peuvent jouer un tout autre rôle, celui d'augmenter l'infectivité du virus.

Le phénomène d'activation ou d'augmentation de l'infection dépendante d'anticorps (AIDA) été décrit pour la première fois par Hawkes en 1964. Il a été mis en évidence dans les infections à virus de la Dengue, virus respiratoire syncitial, HIV et virus Ebola. L'AIDA a été aussi observée dans les infections à virus de la famille des *Picornaviridae*, notamment poliovirus et coxsackievirus B.

La détection d'ARN entéroviral ayant une forte homologie avec CV-B3 et CV-B4 et d'IFN-α ainsi que d'ARNm d'IFN dans le sang périphérique de patient avec un DT1 a mené à la découverte de l'activation du pouvoir inducteur d'IFN-α de CV-B4 vis-à-vis de CMN (cellules mononucléaires) lorsque le virus est incubé au préalable avec des anticorps spécifiques (Hober et *al.,* 2001).

Il a été observé que des immunoglobulines (Ig) G, dépourvues d'Acs neutralisants présentes dans le sérum/plasma de patients atteints de DT1 interagissent avec le virus et avec le récepteur Fc gamma II (FcγRII) ainsi que FcγRIII pour augmenter la production d'IFN-α par les CMN *in vitro* induite par CV-B4. Les complexes immuns CV-B4/IgG se lient à CAR et aux FcγRII et III à la surface des monocytes (Hober et *al.,* 2001).

L'inoculation de CV-B4 à des cultures de CMN issus de patients avec un DT1, mais pas de CMN de sujets contrôles, induit la production d'IFN-α, à cause d'IgG anti-CV-B4 liés aux FcγRII et III à la surface des CMN (Hober et al., 2002).

Il a été montré que les cellules productrices d'IFN-α en réponse au complexe CV-B4/IgG sont les monocytes $CD14^+$ (Hober et al., 2001).

Le CV-B4 incubé avec du sérum immun ou des IgG puis inoculé aux CMN stimule la production d'IFNα et des cytokines inflammatoires (Alidjinou et al., 2013)

La cible des anticorps facilitants a été identifiée, il s'agit de la protéine VP4, ce qui a permis d'élaborer une méthode immunoenzymatique pour les détecter (Chehadeh et *al.,* 2005 ; Sauter et *al.,* 2007).

V. Immunité innée anti-Coxsackievirus B

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les pathogènes. Lors de l'infection, les Interféron (IFN) de type I sont activés par des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), qui sont produits lors de la réplication virale, comprenant des acides nucléiques sous la forme d'ADN simple brin et double brin, ARN simple et double brin et des glycoprotéines virales (Yan & Chen, 2012). Ces PAMP sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR). Les virus à ARN comme les entérovirus sont détectés par 3 types de PRR : les récepteur Toll-like (TLR), récepteurs (RIG-I)-like (RLR) et les récepteurs NOD-like (NLR) (Takeuchi & Akira, 2009).

Les TLR détectent les PAMP à la surface cellulaire ou dans les endosomes/lysosomes. Les TLR 3, 7/8 et 9 reconnaissent l'acide nucléique viral (Xagorari & Chlichlia, 2008). Par exemple, le TLR 3 reconnait l'ARN viral double brin produit lors de la réplication et le TLR 7/8 reconnait l'ARN viral simple brin. La signalisation de TLR3 dans les macrophages est responsable de la réponse immune innée vis-à-vis de CV-B4 (Richer M.J. et al., 2009). En effet, des souris déficientes en TLR3 lors d'une infection par CV-B4, ont une réponse pro-inflammatoire réduite et une réplication virale plus importante (Richer M.J. et al., 2009).

La reconnaissance de composants viraux par les TLR active des adaptateurs contenant un domaine TIR (Toll/Il-1 receptor) comme MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) et TRIF (Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptors inducing IFN) qui transmettent le signal de détection d'un PAMP (Takeda & Akira, 2005).

TLR3 active l'adaptateur TRIF conduisant à l'activation du facteur de transcription IRF3 (Interferon regulatory factor 3) qui induit l'expression des IFN de type I et la surexpression d'IP-10 (IFN-inducible protein 10). Par ailleurs, TLR3 active aussi NF-κB (nuclear factor kappa B) qui stimule la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6 et le TNFα (Takeuchi & Akira, 2010 ; Yokota et al., 2010 ; Kawai & Akira, 2006).

Ainsi, de nombreuses cytokines et chimiokines sont produites lors de l'infection par les entérovirus (Nair et al., 2010). Ces cytokines et chimiokines ont un rôle important dans le recrutement des cellules du système immunitaire vers le site de l'infection et leur activation.

1. Les monocytes - macrophages

Les monocytes du sang circulant dérivent des cellules myéloïdes progénitrices qui ont pour origine les cellules souches hématopoïétique de la moelle osseuse (Van furth & Cohn, 1968). Chez la souris, les monocytes forment une population hétérogène avec les $Ly6C^{+}$ qui sont inflammatoires et les $Ly6C^{-}$ circulants. Les monocytes sont équipés de récepteurs de chimiokines et de PRR qui leurs permettent de migrer du sang vers les tissus et les sites d'inflammation. Ces cellules ne se répliquent pas et circulent dans la voie sanguine, la moelle osseuse et la rate (Auffray C. et al., 2009). A l'état normal ou lors d'une inflammation, les monocytes quittent la voie sanguine et migrent dans les tissus où ils se différencient en macrophages et cellules dendritiques.

Il est admis qu'en absence d'inflammation les monocytes quittent la voie sanguine et migrent vers les tissus pour reconstituer le 'stock' de macrophages résidents (Gordon & Taylor, 2005). Cependant, de récentes études viennent contredire ce dogme et suggèrent que les macrophages résidents se répliquent et maintiennent leur population locale indépendamment des monocytes (Hashimoto et al., 2013). En effet, une étude récente a montré que des macrophages résidents ont pour origine des précurseurs qui dérivent du sac vitellin durant le développement embryonnaire indépendamment des cellules souches hématopoïétiques (Schulz et al., 2012).

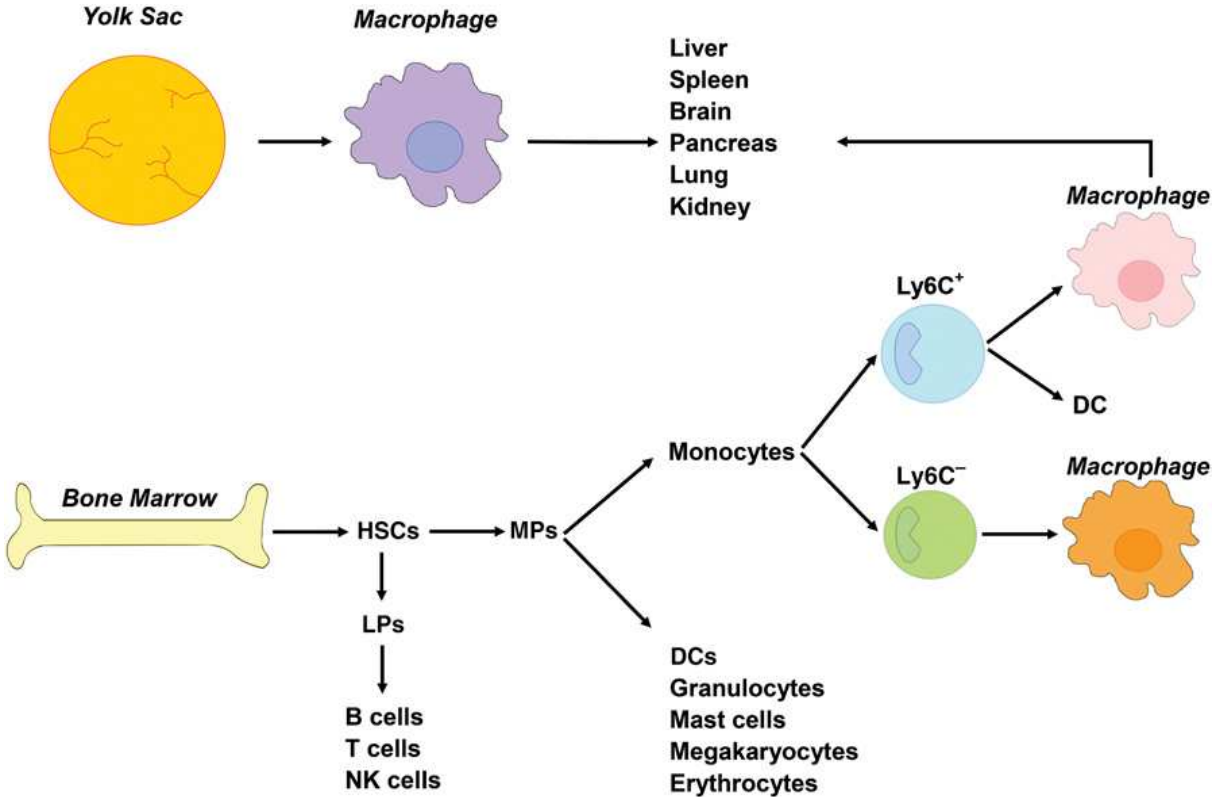

Figure 9: Origine des macrophages chez la souris. (Van Gassen et al., 2015)

Les macrophages font partie de la première ligne de défense de l'immunité innée et ont un rôle important dans la réponse immunitaire. Les macrophages résidants sont présents dans tout l'organisme. Il existe une grande variété de macrophages en fonction du milieu dans lequel ils se trouvent : macrophages alvéolaires (poumons), cellules microgliales (cerveau), cellules de kupffer (foie), macrophages spléniques, intestinaux, intraoculaires et de la moelle osseuse. Durant l'homéostasie, les macrophages résidants sont dans un état de repos.

Les macrophages matures sont polarisés en macrophages M1 (activation classique) ou macrophages M2 (activation alternative) phénotypiquement très différents. Ils sont surtout différenciés par leurs marqueurs de surfaces et les cytokines secrétées.

Les macrophages M1 sont principalement activés par l'IFNγ mais aussi par le LPS, TNFα et le GM-CSF. Durant l'infection, les macrophages M1 sont impliqués dans la réponse immunitaire de type Th1. Ils expriment l'iNOS (inducible nitric oxide synthase) et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL-12, l'IL-1β, l'IL-6 qui stimulent la différentiation des lymphocytes Th1 (Flavell et al., 2010).

Les M2 sont activés durant la réponse immune de type Th2 par l'IL-4 et l'IL-13 et sont responsables de la guérison des tissus et du remodelage et de la restauration de la fonction des tissus (Flavell et al., 2010).

Il a été suggéré que les macrophages jouaient un rôle dans la pathogenèse du diabète de type 1 (Gordon, 2003). Ces cellules sont détectées dans l'infiltrat inflammatoire des ilots de souris NOD. La déplétion en macrophages de ces souris prévient le développement du diabète de type 1 (Hutchings & Cooke, 1990).

Les macrophages M1 déclenchent une réponse inflammatoire qui initie l'insulite et la mort des cellules β durant le DT1. Ces macrophages répondent à un pathogène intracellulaire par la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire, TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-23 et IL-12 et expriment les molécules de costimulation essentielles pour l'activation des lymphocytes T et produisent de l'oxyde nitrique suite à l'expression de l'oxyde nitrique synthase (Espinoza-Jiménez A. et al., 2012) ce qui provoque la mort des cellules β.

2. Interférονγ induit par la protéine 10 (IP-10)

L'IP-10 appelée aussi C-X-C motif ligand 10 (CXCL 10) appartient à la sous-famille des chimiokines CXC. L'IP-10 agit via la fixation au récepteur CXCR3, un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G.

Sous l'effet de différentes cytokines (IFNγ, TNFα, IL-1β), l'IP-10 est secrétée par plusieurs types cellulaires, les lymphocytes T, les neutrophiles, les monocytes, les splénocytes, les fibroblastes, etc. Il a été montré que l'IP-10 est produite rapidement après l'infection par les rhinovirus, les coxsackievirus, le virus de l'hépatite B et C, le virus Ebola et le virus de la Dengue (Liu et al., 2011).

La détection d'IP-10 périphérique à forte concentration est un marqueur de réponse immunitaire de type (Th) 1. Cette chimiokine a la capacité d'attirer les monocytes, macrophages, les lymphocytes T et les cellules NK (Taub et al., 1995 ; 1996).

Les lymphocytes Th 1 sont responsables de l'augmentation de la sécrétion de TNFα et d'IFNγ qui vont à leur tour stimuler la sécrétion d'IP-10 par différents cellules créant ainsi une boucle d'amplification (Antonelli et al., 2008).

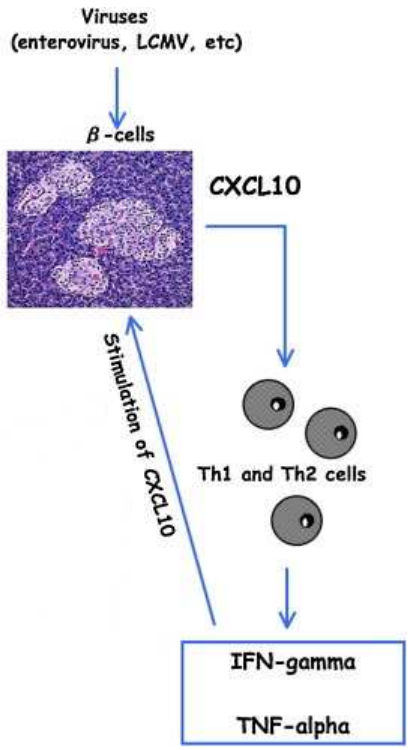

Figure 10: Les lymphocytes Th1 sont responsables de la sécrétion de TNFα et IFNγ qui à leurs tour vont agir sur différentes cellules, notamment les cellules pancréatiques pour sécréter l'IP-10 créant ainsi une boucle d'amplification (Antonelli A. et al., 2014).

L'IP-10 est retrouvé à forte concentration dans le sérum de patients diabétiques de type 1 (Shimada A. et al., 2001 ; Nicoletti F. et al., 2002 ; Nakagawa Y. et al., 2003). Le niveau sérique d'IP-10 était plus élevé chez les patients atteint de DT1 que les contrôles. Plusieurs études ont montré que l'IP-10 est hautement exprimé dans les lymphocytes infiltrant les ilots de Langerhans et que les cellules β sous l'influence de cytokines (TNFα et IFNγ) peuvent moduler la réponse immune par la production de chimiokines telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11. Ces chimiokines vont attirer les cellules immunitaires activées qui vont secréter encore davantage de TNFα et d'IFNγ stimulant la production de chimiokines et créant ainsi une boucle. De plus, l'IP-10 a été identifié comme la chimiokine dominante exprimée dans l'environnement des ilots d'animaux prédiabétique et de patients atteint de DT1 (Frigerio et al., 2002 ; Roep et al., 2010 ; Uno et al., 2010).

Par conséquent, la voie métabolique IP-10/CXCR3 joue un rôle important dans la réponse immune et la destruction des cellules β dans le cas du diabète de type 1.

3. Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα)

Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNFα) est considéré comme la cytokine la plus pléiotrope (Sedger & McDermott, 2014). Le TNFα est principalement produit par les macrophages, lymphocytes T, cellules NK, cellules dendritiques mais aussi par d'autres types cellulaires (Sedger & McDermott, 2014).

Le TNFα est une protéine transmembranaire de 26 kDa. Le TNF peut être clivé dans le domaine extracellulaire par des metalloprotéinases ce qui engendre la libération du TNF sous sa forme soluble de 17kDa. Le TNFα possède deux récepteurs, le TNF-RI et le TNF-RII.

Le TNF n'est habituellement pas détecté chez des individus sains. Des taux sériques élevés de TNF sont retrouvés dans les cas d'inflammation ou d'infection (Robak et al., 1998). TNFα est produit par les lymphocytes avec l'IFNγ. Ces cytokines sont toxiques pour les cellules β. L'infection de cellules β par les Coxsackievirus B *in vitro* induit l'expression de plusieurs chimiokines et cytokines notamment le TNFα (Nair et al., 2010).

4. Interféron gamma (IFNγ)

Interféron gamma (IFNγ), aussi connu sous le nom d'interféron de type II ou facteur d'activation des macrophages (MAF), a été identifié grâce à son activité antivirale. La protéine mature a un poids moléculaire de 17 kDa (Farrar et al., 1993).

L'IFNγ est un important médiateur d'inflammation, il est induit en réponse à une stimulation du système immunitaire, une altération des tissus ou suite à la réplication virale (Horwitz Et al., 1999).

L'IFNγ est secrété par les lymphocytes et les cellules NK pour lutter contre l'infection virale (Loh et al., 2005).

VI. Lutte anti-entérovirale

L'identification des virus impliqués dans le développement du diabète de type 1 pourrait permettre une approche préventive par vaccination (Drescher et al., 2014 ; Hyöty & Knip 2014). La persistance de certains virus dans les cellules β agit comme un déclencheur du DT1 et pourrait être la cible d'une approche pharmacologique pour éliminer l'infection virale et prévenir l'initiation de la maladie.

1. Vaccination

Une réponse inflammatoire excessive est délétère aux cellules β infectées. Par conséquent, un vaccin qui augmente la réponse immune aggraverait la maladie. Idéalement, un vaccin anti-coxsackievirus devrait engendrer une réponse immune neutralisante qui éviterait la primo-infection des cellules cibles. Le vaccin devrait donc contenir du virus non-infectieux inactivé et inoculé à un âge précoce. En effet, la vaccination de souris NOD avec CV-B1 inactivé dans du formol tamponné, induit une production efficace d'anticorps neutralisants qui empêche la réplication virale et retarde le début de la maladie chez ces animaux (Larsson et al., 2015).

1. Traitements antiviraux

Au présent, il n'existe pas dans les pays occidentaux de traitements autorisés pour lutter contre les infections entérovirales. Néanmoins, des antiviraux qui agissent à différentes étapes du cycle viral peuvent réduire avec succès la réplication des entérovirus.

1.1. Le pleconaril

Le pleconaril et ses analogues se fixent dans la « pochette » de la protéine VP1 inhibant ainsi la décapsidation. Le pleconaril est une molécule dérivée d'une série de composés développés par Sterling-Winthrop et appelés « composés WIN ».

Les composés WIN dérivent du dicétone intermédiaire (beta diketone intermediate), plusieurs modifications ont mené au développement de l'Arildone qui inhibe la réplication des poliovirus *in vitro* en empêchant la décapsidation du virion (Caliguiri et al., 1980). Des tentatives d'amélioration de l'activité de l'Arildone a conduit au développement du Disoxaril, qui en culture cellulaire possède un large spectre d'inhibition vis-à-vis des rhinovirus et des enterovirus avec des concentrations allant de 0,004 à 6,2 μg/ml (Otto et al., 1985).

Le disoxaril avait une faible biodisponibilité par conséquent le développement de nouvelles molécules a continué jusqu'à la découverte du pleconaril.

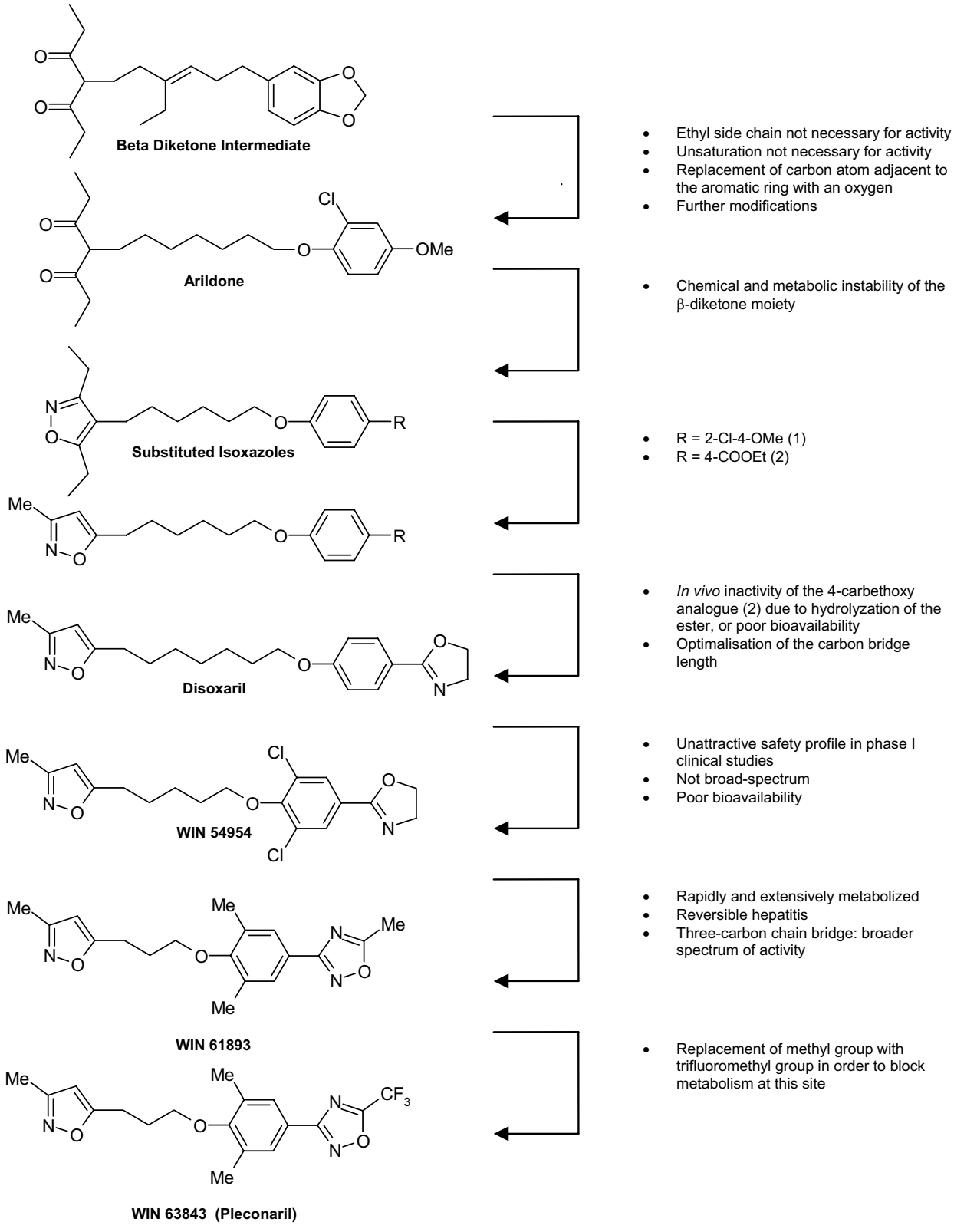

Figure 11: Evolution du Pleconaril (De Palma et al., 2008)

En 1996, ViroPharma a rendu la molécule disponible pour les patients avec de graves infections entérovirales (méningo-encéphalite et myocardite). Après des études pharmacocinétiques chez des nouveau-nés, le pléconaril à une dose de 5,0 mg/kg administré toutes les 8 heures, a fait ses preuves chez 2 sur 3 nouveau-nés qui ont été hospitalisés avec une grave hépatite entérovirale (Kearns et al., 2000 ; Aradottir et al., 2001). Mais en 2002, la FDA américaine n'a pas approuvé le pléconaril pour le traitement du rhume car non convaincue de la sûreté de la molécule (Senior, 2002).

1.2. Pirodavir

Le Pirodavir (ethyl 4-[2-(1-[6-methyl-3-pyridazinyl]-4-piperidinyl)ethoxy]benzoate) appartient aux analogues de pyridazine développé par la fondation pour la recherche Janssen (Andries et al., 1988). Le pirodavir inhibe la réplication des rhinovirus A et B et dans une moindre mesure les autres entérovirus (Andries et al., 1992). En ce qui concerne leur mécanisme d'action, pirodavir rend les virus sensibles, non infectieux par contact direct, et les virus neutralisés deviennent stables à l'acide et à la chaleur, ce qui suggère fortement une interaction directe du composé avec les protéines de capside (Andries et al., 1992).

Les essais pour évaluer l'efficacité thérapeutique du pirodavir par voie intranasale sur le rhume (rhinovirus) n'ont démontré aucun bénéfice clinique et des sensations désagréables au cours traitement ont été notées (Hayden et al., 1995). Le manque d'efficacité clinique du pirodavir peut au moins partiellement être expliqué par sa faible solubilité dans l'eau.

1.3. Chlorure de guanidium

L'un des inhibiteurs des picornavirus les plus étudiés sont les chlorures de guanidium. Cette molécule inhibe la réplication des poliovirus, de plusieurs coxsackievirus et echovirus (Klein et al., 2000 ; Pincus et al., 1986 ; Saunders et al., 1985). Des études ont montré que la molécule inhibe la fonction de la protéine 2C nécessaire pour l'initiation de la synthèse de l'ARN négatif mais pas celle du brin positif ou l'élongation de l'ARN.

1.4. Hydantoïne

Hydantoïne (5- (3,4-dichlorophényl) méthylhydantoïne) inhibe la réplication du poliovirus et CVA21 à plus de 99% à une concentration de 25 mg/ml (Vance et al., 1997). Les études du mécanisme d'action ont révélé que ce composé inhibe l'encapsidation de l'ARN viral (Vance et al., 1997). Verlinden et al., (2000) ont montré que, outre l'inhibition de l'assemblage viral, hydantoïne bloque également le clivage post traductionnel des protéines de poliovirus.

1.5. La fluoxétine

Un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine possède une activité antivirale vis-à-vis d'entérovirus (Zuo et al., 2012). La fluoxétine a réduit la réplication du génome viral de CV-B3 et a bloqué la synthèse des protéines virales (Zuo et al., 2012). Une autre étude a démontré l'effet antiviral de la fluoxétine, qui inhibe la réplication de CV-B3, Echovirus 1, Echovirus 9, Echovirus 11, EV-68 et EV-70. La fluoxétine agit en inhibant la réplication de l'ARN viral. Lorsque la structure chimique de la fluoxétine est comparée à celle d'inhibiteurs de la réplication de l'ARN d'entérovirus tel que TBZE-029 qui cible la protéine virale 2C, des similitudes sont retrouvées. Des substitutions d'acides aminés dans la protéine 2C confèrent une résistance à la fluoxétine (Ulferts et al., 2013).

Notre équipe a étudié l'effet de la fluoxétine dans un modèle d'infection aigue par CV-B4 et aussi sur un modèle d'infection persistante dans des cellules pancréatiques humaines (lignée Panc-1). La réplication de CV-B4 dans un modèle humain d'infection aigue a été inhibé par la fluoxétine. Après traitement par la fluoxétine, les cellules Panc-1 chroniquement infectées ont été guéri au bout de 21 jours, attesté par l'absence de particules infectieuses et d'ARN viral (Alidjinou et al., 2015).

La disponibilité de molécules ciblant les différentes étapes du cycle viral permet un traitement antiviral combiné pour éviter une résistance virale. Un traitement antiviral adapté au stade prédiabétique pourrait éliminer l'infection persistante, réduisant ainsi l'inflammation et le risque d'aggraver l'auto-immunité qui aboutit au DT1.

VII. Objectifs de l'étude

Le diabète de type 1 est une maladie multifactorielle caractérisée par la destruction sélective des cellules β des ilots de Langerhans. Les cellules β pancréatiques produisent et secrètent de l'insuline et lorsque 80-90% des cellules β ont été détruites la production d'insuline devient insuffisante, induisant une hyperglycémie. Le rôle des CVB et notamment de coxsackievirus B4 (CV-B4) dans la pathogenèse du DT1 est fortement suspecté. Une souche de CV-B4 (CV-B4 E2) isolée à partir du pancréas d'un patient souffrant de DT1 est capable d'induire une hyperglycémie chez des souris. Le rôle des entérovirus, et de CV-B4 en particulier, dans le diabète de type 1 et les mécanismes mis en jeu sont encore mal connus. Notre équipe a montré que les monocytes humains *in vitro* sont infectés par CV-B4 grâce à des anticorps anti-VP4 formant des complexes avec le virus, et que les macrophages humains sont infectables également par CV-B4. Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée, présentatrices d'antigène qui peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse du DT1.

Les études réalisées *in vitro* sont riches d'informations mais des modèles d'infection *in vivo* sont nécessaires pour explorer d'avantage les mécanismes des infections à entérovirus. En outre le rôle de cofacteurs dans l'effet diabétogène des CV-B ne peut-être exclu à l'instar de l'impact de doses sub-diabétogénes de streptozotocine β (STZ) qui rendent des souris plus susceptibles à l'effet diabétogène de CV-B3 et CV-B5. Malgré l'impact des entérovirus non-polio en pathologie les moyens de lutte contre ces virus sont limités.

Nos principaux objectifs sont :

- D'étudier l'infection à CV-B4 E2 chez la souris et de déterminer si les monocytes/macrophages sont des cibles du virus *in vivo.*
- De mettre en œuvre et d'étudier un modèle de diabète de type 1 induit par CV-B4 E2 chez des souris non consanguines.
- De tester l'activité de molécules anti-entérovirales *in vitro* et *in vivo* chez la souris.
- De mettre en évidence la survenue d'infections entérovirales naturelles chez des animaux.

MATERIELS & METHODES

- **Virus**

La souche diabétogène CV-B4 E2, a été cultivée sur cellules HEp-2 dans du milieu MEM (Gibco) enrichi avec 10% de sérum de veau foetal (SVF, Sigma), 1% (2 mM) de L-glutamine (Gibco BRL), 50µg/ml de streptomycine, 50UI/ml de pénicilline (BioWhittaker) et 1% d'acides aminés non essentiels (AANE, GibcoBRL). Les surnageants sont recueillis 3 jours après inoculation, centrifugés à 2000 g pendant 10 min, aliquotés et stockés à -80°C. Les titres de virus sont déterminés sur cellules HEp-2 par la méthode de Spearman & Karber et exprimés en DICT50/ml.

L'echovirus 11 a été cultivé sur cellules GMK et l'echovirus 7 sur cellules RD. Les cellules RD et GMK sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) avec 10 % de SVF (Sérum de Veau Fœtal), 50µg/ml de streptomycine, 50UI/ml de pénicilline (BioWhittaker), 1 % de L-Glutamine et 1 % d'Acides Aminés Non Essentiels (AANE).

L'enterovirus G1 (EV-G1) nous a été aimablement fourni par le Dr Antonio Lavazza (IZSLER, Brescia, Italie), et a été cultivé sur les cellules PSEK (également fourni par Dr. Antonio Lavazza). Les cellules ont été maintenues en culture dans du milieu DMEM additionné de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), Pénicilline (100 U/ml), streptomycine (100 mg/ml) et 1% L-glutamine (Invitrogen, Saint Aubin, France). Le titrage viral a été effectué sur des cellules PSEK et le titre a été déterminé avec la méthode Spearman & Karber.

- **Sérum murin**

Des souris ICR-CD1 males âgées de 3 semaines contrôles ou inoculées intrapéritonéalement par CV-B4 E2 ont été sacrifiées et leur sérum récupéré pour tester leur activité facilitatrice. (Elmastour et al., 2016)

- **Inoculation des souris avec le virus.**

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées selon les recommandations Européennes (2010) et ont été approuvées par le comité d'éthique de l'expérimentation animale du Nord-Pas-de-Calais (France).

Des souris mâles CD1 âgées de 3 semaines (Envigo) ont été inoculées avec CV-B4 E2 à une dose de 2.10^4 $DICT_{50}$ par voie intrapéritonéale. Sept jours post-infection (p.i.), les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale: le sang, la rate et la moelle osseuse ont été récupérés et conservés à -80°C.

- **Les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM).**

La moelle osseuse a été isolée de souris (ICR-CD1, Envigo) âgées de 3-5 semaines. Après dislocation cervicale, le fémur et le tibia ont été isolés et séparés du tissu musculaire. La moelle osseuse a été éjectée, à l'aide d'une seringue 23G, dans du milieu DMEM additionné de 10% de SVF, 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco, BRL), 50 µg/mL de Streptomycine, 50 IU/mL de Pénicilline et 1% de L-glutamine. Les cellules ont par la suite été filtrées en utilisant un tamis 70µm (Falcon) et cultivées dans une boite de pétri en additionnant 10ng/mL de M-CSF (Macrophage Colony-stimulating factor) (Cell Guidance Systems, Grande-Bretagne) par 10 ml de milieu de culture. Trois jours après, on rajoute à la culture 5 mL de milieu contenant du M-CSF (10 ng/ml). Quatre jours après, les cellules sont lavées avec du PBS, décollées à l'aide d'un grattoir et centrifugées pendant 10 min à 1500 rpm (4°C). Les cellules sont par la suite remises en culture dans une boite de pétri de 10 cm de diamètre pendant 3 jours à 37°C. Au bout de dix jours, les cellules isolées de la moelle osseuse sont différenciées en macrophages (ou BMDM, Bone marrow-Derived Macrophages). Les BMDM sont mis en culture dans des plaques 6 puits pour les expériences d'infection.

- **Culture primaire des cellules totales de la rate.**

Des souris ICR-CD1 âgées de 3 semaines (Envigo, France) ont été sacrifiées par dislocation cervicale et leurs rates ont été récupérées pour la préparation de culture primaire de cellules totales de la rate comme décrit par Jaidane et al. en 2008. Les cellules ont été préparées sur de la glace, les érythrocytes ont été éliminés par choc hypotonique, et le restant des cellules a été resuspendu dans du milieu RPMI-1640 (Eurobio, Paris, France) additionné de 10% SVF, 1% L-Glutamine, 50µg/mL Streptomycine, 50 IU/mL Pénicilline et 10^{-5} M β-mercaptoethanol (Sigma). Les cellules ont par la suite été réparties dans des micropuits à raison de 5.10^5 cellules/ puits et remises en culture à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% CO_2.

- **Inoculation de cultures de cellules spléniques.**

2µL de sérum de souris infectées par du CV-B4 E2 ont été dilués (1 :1000, 1 :10000 et 1 :100000) et 2µL de sérum de souris non infectées ont été dilués (1 :10000) dans du milieu RPMI en duplicatas et mélangés avec une suspension virale de CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$/ml). Le mélange a été incubé pendant 2h à 37°C. Ensuite, 100µL de ce mélange ou du CV-B4 E2 ont été inoculés en duplicata à une culture cellulaire auxquels 100 µL supplémentaires de milieu ont été ajoutés. 48h après, le surnageant de culture a été récupéré, clarifié et gardé à -

80°C pour la titration de l'activité antivirale et pour l'évaluation du nombre de particules virales. Les cellules de la culture splénique ont été lavées 5 fois avec une solution phosphate saline froide (PBS) et récupérées pour extraction d'ARN.

- **Isolement des populations CD14 et des F4/80 à partir de la rate de souris.**

Les populations positives pour les marqueurs de surface CD14 et F4/80 ont été isolées à l'aide du kit de sélection positive EasySep™ Biotin pour souris (Stem Cell technologies) selon les recommandations du fabriquant. Brièvement, une suspension cellulaire de rate à $2x10^7$ cellules /500µL de milieu est préparée dans un tube de polyester de 5 mL. 10µL d'anticorps bloquant le FcR ont été ajoutés à la suspension, suivi d'anticorps primaire biotinylés anti-CD14 (eBioscience) ou anti-F4/80 (Biolegend) à une concentration finale de 1.5 µg/mL et incubé pendant 15 min à température ambiante. Ensuite, 100 µL/mL de cocktail de sélection de biotine EasySep® ont été ajoutés et incubés pendant 15 autres minutes à température ambiante. Pour finir, 50µL/mL de nanoparticules magnétiques pré-mixées EasySep® ont été ajoutées et incubées pendant 10 min à température ambiante. Le volume total de la suspension cellulaire de 2.5 mL, est obtenu en ajoutant du milieu RPMI, et le tube est placé dans l'aimant pendant 5 min afin de capter les cellules positivement marquées. Sans enlever le tube de l'aimant, le surnageant contenant la fraction non marquée est transvasé dans un autre tube. Le tube est séparé de l'aimant, et 2.5 mL de milieu sont ajoutés et la suspension cellulaire restantes (positivement marquées) est ainsi mélangée délicatement par aspiration et refoulement à l'aide d'une pipette. Le tube est par la suite replacé dans l'aimant, et la même procédure est répétée 4 fois. Au final, le tube est séparé de l'aimant, et les cellules sélectionnées positivement sont reprises dans du milieu de culture. Les cellules restantes sont elles aussi récupérées.

- **Cytométrie en flux et Tri cellulaire.**

Les souris infectées ou non par CV-B4 E2 sont sacrifiées et leurs rates sont récupérées et traitées comme précédemment mentionné. Les cellules sont culottées et fixées dans 2% de paraformaldéhyde pendant 10 min à température ambiante. Elles sont par la suite lavées 2 fois et reprises dans 500 µL de solution PBS, 1% BSA. Trois millions de cellules/100µL de solution BSA sont distribuées dans les tubes, et les récepteurs Fc sont bloqués avec l'anticorps anti-CD16/35 (Clone 93, Biolegend). Les cellules sont par la suite marquées avec

les anticorps marqués PE-anti-F4/80 et FITC-anti CD14 avec leurs isotypes contrôles correspondants (Biolegend) pendant 30 min à 4°C. Les cellules ont été lavées et reprises dans 400 µL de PBS pour analyse ou tri cellulaire (BD FACS Aria). Les cellules non marquées ont été utilisées comme contrôle négatif d'autofluorescence.

- **Streptozotocine**

La streptozotocine (STZ, Sigma-Aldrich) est formée par plus de 75% de l'isomère α. En effet, la STZ ($C_8H_{15}N_3O_7$, 265,22 g/mol) est formée par deux isomères α et β et il s'avère que l'isomère α est plus toxique que le β. Une fois la STZ en solution, elle devient instable du fait de la mutarotation du glucopyranose qui tend à un état d'équilibre entre les deux isomères, de ce fait la préparation de la solution de STZ doit être extemporanée.

La STZ est solubilisée dans un tampon de citrate de sodium (Sigma, pH à 4,5).

- **Cellules**

La lignée cellulaire Min-6 (cellules β murine sécrétrices d'insuline) aimablement fournie par Pr. A. ABDERRAHMANI (Faculté de Médecine de Lille), provient d'une tumeur endocrinienne. Ce sont des cellules adhérentes, cultivées à 37°C, sous atmosphère à 5% de CO_2 en milieu DMEM supplémenté avec 15% de sérum de veau fœtal (SVF Gibco®), 1% d'une solution de sodium pyruvate, 1% d'antibiotique pénicilline et streptomycine (Gibco®), 1% d'une solution de L-Glutamine à 200mM (Gibco®) et 83µM de Beta-mercaptoéthanol (Sigma®).

- **Titrage du virus infectieux**

L'aptitude des cellules Min-6 ayant reçues de la STZ puis infectées par CV-B4 E2 à produire et à libérer des particules virales infectieuses dans les surnageants de culture ont été évaluées sur cellules HEp-2 et mesurée par la méthode de Spearman & Karber. Les titres infectieux sont exprimés en $DICT_{50}$/ml.

- **Inoculation de streptozotocine et de virus et suivi des souris**

Des souris mâles ICR-CD1 âgées de 3 semaines ont été inoculées avec une dose de 35 mg de STZ / kg de souris. A j12 suivant le traitement par STZ, ces mêmes souris sont inoculées avec 200µl d'une suspension de CV-B4 E2 à 2.10^4 $DICT_{50}$. A la fin du suivi, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale, et leurs pancréas sont récupérés dans du formol tamponné

pour étude anatomopathologique ou bien congelés à -80°C pour recherche d'ARN ou de particules infectieuses.

- **Broyage des organes et extraction de l'ARN total**

Le pancréas est d'abord pesé puis broyé dans 1 ml de PBS, supplémenté par un cocktail d'inhibiteur de protéases (cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche), à l'aide d'un broyeur (TissueRuptor Qiagen). Le broyat est ensuite centrifugé à 2500 g à 4°C pendant 10 min puis aliquoté et stocké à -80°C.

Un aliquote de broyat est homogénéisé dans 900µl de Tri-Reagent® et incubé 5 min à température ambiante. Le surnageant repris dans un autre tube est additionné de 200µl de chloroforme (Sigma), vortexé et incubé 15 min à température ambiante puis centrifugé 15 min à 12000 g à 4°C. Ceci aboutit à la séparation de l'ARN contenu dans la phase aqueuse, des protéines contenues dans la phase organique et de l'ADN à l'interphase. La phase aqueuse récupérée dans un nouveau tube est additionnée d'environ 500µl d'isopropanol (Sigma) et incubée 10 min à température ambiante puis centrifugée 15 min à 12000 g à 4°C pour précipiter l'ARN en solution. Le culot est lavé 2 fois en centrifugeant 5 min à 12000 g à 4 °C dans 1ml d'éthanol (Sigma) à 75% fraîchement dilué dans de l'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma), puis séché à température ambiante et redissout dans 50µl d'eau nuclease-free (Promega). L'ARN ainsi obtenu est aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à son utilisation. L'un des aliquotes est directement utilisé pour le dosage de l'ARN extrait.

- **PCR en temps réel quantitative (qRT-PCR)**

Le coffret AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene®) a été utilisé pour la rétrotranscription de l'ARN de CVB4 en ADNc. L'amorce anti-sens est utilisée à 10 µM comme matrice. La réaction est réalisée pour environ 0,3 pg à 3 µg d'ARN extrait dans un volume final de 20 µl contenant 12.5 µl de Master Mix 2x, 0,3 µg d'oligo (dT) et de 20 U d'AffinityScript revers transcriptase. La réaction de rétrotranscription est alors effectuée avec une première incubation à 25°C pendant 5 mn pour l'hybridation des amorces, suivie de la synthèse de l'ADNc à 42°C pendant 15 mn et de 5 mn d'élongation finale à 95°C. La PCR est ensuite réalisée avec le coffret Brillian® II QPCR Master Mix (Stratagene®), avec sa sonde spécifique aux entérovirus, dans un volume final de 25 µl contenant le Mix 2x, 10 µM pour chacune des amorces sens et anti-sens et l'ADNc précédemment amplifié. Le mélange réactionnel est soumis à une première étape de 10 mn à 95°C de dénaturation et d'activation de la polymérase, suivie de 40 cycles consistant chacun en 30 s à 95°C de dénaturation, 1 mn

à 60°C d'hybridation. Les réactions sont réalisées dans le thermocycleur Mx3000P® (Stratagene®). Un ARN standard d'entérovirus (Enterovirus 71 RNA Control Vircell Microbiologists®) a été utilisé pour obtenir une gamme avec les concentrations suivantes : 12500 copies/µl, 1250 copies/µl, 125 copies/µl, 12,5 copies/µl et 1,25 copies/µl. La courbe standard du Ct en fonction du nombre de copies/µl a été construite à partir de cette gamme d'étalonnage afin de quantifier l'ARN de CVB4 présent dans les échantillons. Les résultats sont exprimés en nombre de copies par µl d'extrait, puis rapportés à la quantité d'ARN total déterminé dans les extraits en ng.

- **Quantification d'IP-10 de TNFα et d'IFNγ dans le broyat de pancréas par méthode ELISA**

IP-10

Les concentrations d'IP-10 ont été mesurées à l'aide du kit « ELISA Mouse IP-10 » de Affymetrix eBioscience®. Une microplaque a été coatée avec 100 µl d'anticorps de capture spécifiques (0,25 µg/ml) puis incubée une nuit à 4°C. Ensuite la plaque est lavée 2 fois avec avec du PBS 0,05% Tween 20 puis on ajoute 250 µl de tampon de saturation (PBS 0,05% Tween20, 0,5% BSA) afin de bloquer les sites non spécifiques. Après 2h d'incubation à température ambiante, la plaque est lavée 2 fois, et on ajoute 100 µl de standards préalablement dilués en cascade de ½ en ½ et 100 µl de surnageants à doser dilués au ½. Ensuite, on ajoute 50 µl d'anticorps secondaire biotinylés (1:1000). Après 2h d'incubation à température ambiante sur un agitateur 6 lavages sont effectués, puis 100 µL de streptavidine-HRP (1:5000) préalablement diluée sont ajoutés. La plaque est de nouveau incubée à température ambiante pendant 1h sur un agitateur de plaque. Après 6 lavages, 100 µl de substrat (tétraméthylbenzidine) sont ajoutés et la plaque est incubée 10 minutes à température ambiante à l'obscurité. La réaction a été stoppée en ajoutant 100 µl de la solution stop H2SO4 (1M). L'absorbance a été lue au lecteur de plaque ELISA (Thermo Multiskan GO) à 450nm.

TNFα

La quantité de TNF-α par a été mesurée à l'aide du kit « ELISA Mouse TNF-α » de Affymetrix eBioscience®.

Une microplaque a été coatée avec 100 µl d'anticorps de capture à 4°C toute une nuit. Le lendemain, la plaque est lavée 3 fois avec 250 µl de tampon de lavage (PBS 0,05% Tween 20). Puis on ajoute 200 µl de tampon de saturation. Après 1h d'incubation à température

ambiante, la plaque est lavée 1 fois avec 250 µl de tampon de lavage. Puis, 100 µl de standards préalablement dilués en cascade de ½ en ½ sont ajoutés ainsi que 100 µl de surnageants à doser (1 :30). Après 2h d'incubation, 5 lavages ont été effectués puis 100 µl d'anticorps secondaire biotinylés, préalablement dilués, sont ajoutés dans les puits et incubés à nouveau à température ambiante pendant 1h. Après 5 lavages avec 250 µl de tampon de lavage, 100 µl d'avidine-HRP préalablement dilués sont ajoutés et les plaques sont de nouveau incubées à température ambiante pendant 30min. 100 µl de substrat (TMB) sont ajoutés après lavage et la plaque est incubée 15 minutes à l'obscurité avant l'ajout de la solution d'arrêt. L'absorbance a été lue au lecteur de plaque ELISA (Thermo Multiskan GO) à 450nm

IFNγ

Le dosage d'IFN-γ par la méthode ELISA à été réalisé à l'aide du kit « ELISA IFN-γ murin» de Covalab®.

Une microplaque a été coatée avec 100 µl d'anticorps de capture à 4°C toute une nuit. Le lendemain, la plaque est lavée 2 fois avec une solution de PBS 1X. Puis on ajoute 250µL de tampon de saturation pendant 2h à température ambiante. Puis la plaque est lavée 3 fois, et 100µL des standards ou gamme étalon préalablement dilués en cascade de ½ en ½, ainsi que les surnageants à doser dilué au ½ y sont déposés. Ensuite 50µL d'anticorps secondaires, préalablement dilués, sont déposés dans la plaque, puis celle-ci est incubée à nouveau à température ambiante pendant 4h. Ensuite, 2 lavages sont effectués, puis 100µL d'avidine-HRP préalablement diluée, sont ajoutés. La plaque est de nouveau incubée à température ambiante pendant 30min. La plaque est lavée 2 fois, puis 100µL de substrat (TMB) sont ajoutés et incubée 10 minutes à l'obscurité. Enfin, 100µL de solution stop de H2SO4 sont ajoutés. L'absorbance a été lue au lecteur de plaque ELISA (Thermo Multiskan GO) à 450nm

- **Quantification d'insuline sérique par méthode ELISA**

Le kit « ELISA Mouse insulin» de Mercodia® a été utilisé pour quantifier l'insuline sérique. 10µL de la gamme et des échantillons (1:10) sont déposés dans les puits de la plaque préalablement coatée avec un anticorps anti-insuline et prêt à l'emploi. Ensuite on ajoute 100µL d'anticorps anti-insuline conjugués avec de la peroxydase préalablement diluée.

Après 2h à température ambiante sur un agitateur de plaque, 6 lavages sont effectués, puis 200µL de substrat (TMB) sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée 15 min à

température ambiante à l'obscurité. La peroxydase va transformer ce substrat en produit coloré, qui permettra de doser l'absorbance de cette plaque par spectrophotométrie et ainsi déterminer la concentration en insuline présente dans nos échantillons biologiques. Enfin, après ces 15 minutes d'incubation, 50µL de solution stop de H2SO4 sont ajoutés et les absorbances sont lues au lecteur de plaque ELISA (Thermo Multiskan GO) à 450nm.

- **Analyse histologique**

Les organes ont été fixés dans du formol tamponné puis inclus dans de la paraffine et coupés en des sections de 5µm d'épaisseur. Les coupes sont par la suite déparaffinées puis déshydratées par du xylène pendant 10 min. Les coupes sont ainsi déshydratées et afin de pouvoir les colorer elles doivent être réhydratées par des bains aux degrés décroissants d'éthanol (100, 95, 70 et 50°) et enfin un bain d'eau. La coloration se fait par 15 min d'incubation dans l'hématoxyline suivie par un lavage à l'eau courante puis une étape dite de différentiation qui consiste en un bain de HCl à 1% d'éthanol puis incubation dans de l'eau pendant 5 min. La coloration du cytoplasme se fait par incubation dans de l'éosine pendant 5 min suivie par un lavage à l'eau pour éliminer l'excès de colorant. Les coupes sont à nouveau déshydratées puis montées entre lames et lamelles et observées à l'aide du scanner Zeiss Axioscan (Z1).

- **Molécules de synthèse**

Les molécules dérivées du pleconaril et du pirodavir sont aimablement fournies par le Pr. Pompei (Italie, Université de Cagliari) sont diluées dans du DMSO. Le favipiravir (Sigma) et la fluoxétine (Sigma) sont dilués dans du DMSO.

- **Test de cytotoxicité**

$1{,}25.10^4$ cellules/puits dans 50µL sont distribuées dans une microplaque 96 puits Les cellules sont ensuite incubées durant 24h. Les différents antiviraux sont pré-dilués au 1/1000ème pour le 6230, au 1/100ème pour le 6373 et le 6502 et au 1/10ème pour le 6473 puis diluées de demi en demi. 100µL de solution contenant les molécules à tester sont ensuite ajoutés dans les puits. Pour le DMSO, la dilution est réalisée de la même manière que pour les antiviraux. 100µL de DMSO sont ajoutés dans les puits contrôles. Une lecture de la viabilité cellulaire est ensuite effectuée avec l'Orangu après 48h d'incubation à 450nm.

- **Test d'activité antivirale**

50µL de cellules à raison de $1{,}25.10^4$ cellules/puits sont distribuées dans une microplaque 96 puits Les cellules sont ensuite incubées durant 24h. 100µL d'antiviraux dilués de demi en demi sont ajoutés aux concentrations non toxiques. 50µL virus sont ajoutés à raison de $1{,}25.10^4$ virus/puits afin d'obtenir une MOI = 1. Une évaluation de la viabilité cellulaire par Orangu (Cell guidance systems) est ensuite réalisée après apparition de 100 % d'ECP (Effet CytoPathogène) à 48h dans le témoin virus (cellules + virus).

- **Sérum de porcelet**

Toutes les expérimentations ont été effectuées en suivant les recommandations du guide 2010 EU et ont été approuvées par le comité d'éthique de l'expérimentation animale.

Un groupe de 10 porcelets « breed Danish Landrace X Piétrain » âgées de 9 semaines ont été fournies à CODA-CERVA où les expériences sont effectuées. L'échantillonnage de sang a été effectué à partir de la veine cave dans des tubes secs à J1 et J39. Le sérum a été obtenu après centrifugation et conservé à -20°C.

- **Test de séroneutralisation**

L'activité antivirale du sérum porcin a été évaluée par un test de séroneutralisation. Des séries de dilution de 50µL du sérum ont été mélangé V/V avec du milieu DMEM dans une plaque à 96 puits, puis 25µL de la suspension virale contenant 10^4 TCID50/mL de EV-G1 ont été rajouté à chaque puits. Après 2h d'incubation à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% CO_2, 100 µL of DMEM contenant 1.10^5 de cellules PSEK a été rajouté à chaque puits, puis les plaques ont été incubée pendant 48h à 37°C. Les résultats ont été exprimés à l'inverse de la dilution finale (titre) qui inhibe l'effet cytopathique induit par le virus.

- **ELISA pour la détection d'anticorps anti-VP4 d'EV-G**

Pour détecter les anticorps anti-VP4 dans le sérum porcin, des plaques 96 puits (F8 Maxisorp, Nunc immune-module, Thermo Scientific, Denmark) ont été coatés toute la nuit à température ambiante avec un peptide de la protéine VP4 d'EV-G1 composé de 50 acides aminés (BACHEM, Switzerland) à 10 µg/mL dans du PBS, pH 7,4. Les puits ont par la suite été lavés trois fois avec une solution de lavage (PBS 1X, pH 7.4, 0.05% Tween 20), saturés pendant 1 heure à 37°C avec un tampon de saturation (PBS, pH 7.4, 1% BSA, 0.0375% Tween 20), puis lavés encore quatre fois avec la solution de lavage. Ensuite, 0.1 ml de sérum dilué dans du

tampon (PBS 1X, pH 7.4, 2% BSA, 0.0375% Tween 20, 0.3M NaCl) au 1/50ème ont été ajoutés. Après une heure d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés quatre fois et 0.1 mL d'IgG de lapin anti-sanglier sauvage lié à la biotine (USCN Life Science INC) dilué au 1/100ème ont été ajoutés puis les plaques ont été incubées pendant 1h à 37°C. Après 6 lavages 0,1 ml d'extravidine peroxydase (Sigma) sont ajoutés pendant 1h à 37°C. Les puits ont été lavés encore une fois et 0,1 ml de la solution de substrat (0,4 mg/ml o-phenylenediamine, 0,012% H2O2 dans 0,05 M tampon phosphate citrate, pH 5.0; Sigma- Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) ont été ajoutés pendant 30 minutes à température ambiante. La solution a été arrêtée par l'ajout de 25 µl d'acide sulfurique 3M (Sigma-Aldrich). L'absorbance a été mesurée à 490 nm par un lecteur de plaques Dynex MRX (Thermo Life Science, Cergy Pontoise, France). Les résultats sont exprimés en densité optique (DO).

- **Analyse des séquences protéiques**

La séquence du peptide VP4 utilisée pour l'ELISA et pour l'étude *in silico* a été sélectionnée de la séquence poly-protéique de l'entérovirus G1 (GenBank Protein accession number AIA21703). Les séquences de la protéine VP4, et de la polyprotéine d' EV-G1, EV-G2, EV-G3, EV-G5, EV-G6, EV-G et de *Teschovirus* et *Sapelovirus* utilisés pour l'alignement ont été retrouvées dans GenBank.

- **Alignement**

Les séquences de protéines ont été alignées en utilisant la version web de Clustal Omega.

- **Analyse statistique**

L'analyse statistique des résultats sérologiques a été effectuée avec le test T Apparié de Wilcoxon (GraphPad quickCalcs). Les différences ont été considérées significatives pour une *p value* < 0,05.

RESULTATS

I. Monocytes et macrophages cibles de CV-B4 E2 *in vitro* et *in vivo*

1. CVB4 E2 est retrouvé dans la rate et les cellules de la moelle osseuse isolées de souris inoculées par le virus

Les souris ont été inoculées par voie intra-péritonéale avec CVB4 E2 comme indiqué dans la section matériels et méthodes. Sept jours après l'inoculation, la rate, la moelle osseuse et le sang ont été collectés. Le taux d'ARN entéroviral intracellulaire mesuré par RT-qPCR était 3,14 +/- 0,32, 3,18+/- 0,25 and 1,15+/-0,26 log copies/ng d'ARN total respectivement (Fig. 12 A).

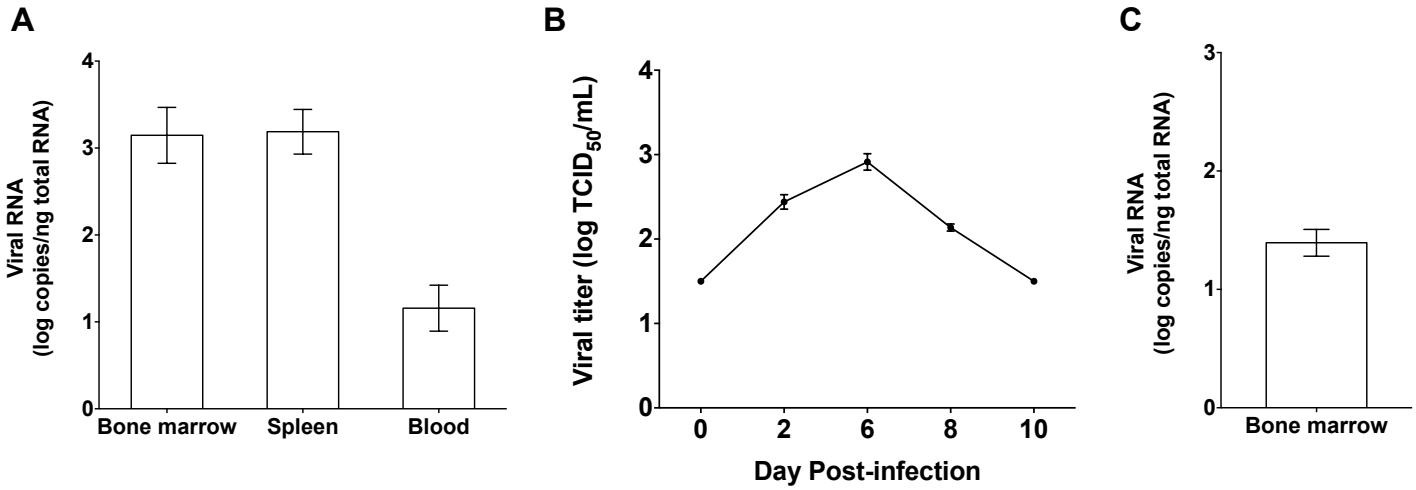

Figure 12: Infection de souris ICR-CD1 avec CV-B4 E2. Des souris ICR (CD1) ont été inoculées avec CV-B4 E2 par voie intra-péritonéale (2.10^4 $DICT_{50}$), 7 j post-inoculation les souris ont été sacrifiées pour collecter sang, rate et moelle osseuse. La quantité d'ARN entéroviral dans les tissus a été mesurée par RT-qPCR les résultats sont exprimés en log de copies d'ARN par ng d'ARN total (A). Une partie des cellules de la moelle osseuse a été réservée à la culture dans du milieu contenant du M-CSF. Le titre infectieux des surnageants de cultures prélevés à différents moments a été déterminé les résultats sont exprimés en log de $DICT_{50}$/ml (B) et la quantité d'ARN entéroviral dans les cellules prélevées le $10^{ième}$ jour de culture a été mesurée par RT-qPCR (C). Les résultats sont la moyenne +/- écart-types de trois expériences indépendantes. La limite de détection du test de détermination du titre infectieux est 1,5 log $DICT_{50}$/ml.

Les cellules de la moelle osseuse ont été mises en culture. Les cellules de la moelle osseuse n'ont pas survécu aux conditions de culture au-delà d'une seule journée. En effet, la proportion des cellules mortes était supérieure à 80% au bout du deuxième jour de culture.

Quand les cellules de la moelle osseuse ont été cultivées *in vitro* dans du milieu contenant du M-CSF, le nombre de cellules mortes au dixième jour était inférieur à 5%. Dans ces conditions, des particules virales ont été détectées dans le surnageant de culture, et le titre viral correspondant était 2,44+/- 0,08 log $DICT_{50}$/ml à 2 jours p.i et 2,91+/- 0,09 log $DICT_{50}$/ml au $6^{ème}$ jour p.i. Puis le titre viral décroit pour atteindre au $10^{ème}$ jour p.i. 1,5 log $DICT_{50}$/ml, qui correspond à la limite de détection de la technique (Fig. 1 B). Au dixième jour, la détection de particules virales dans le surnageant de culture était négative, cependant la présence d'ARN viral intracellulaire était mise en évidence (1,39 +/- 0,11 log copies/ng d'ARN viral.) (Fig. 12 C).

Les cellules spléniques de souris infectées ont été maintenues en culture pendant 5 jours en absence ou en présence de M-CSF. Au delà du deuxième jour de culture, la viabilité était diminuée : < 70% à J3, et 10% à J5. Les titres infectieux des surnageants de culture récupérés à J0, 1, 3 et 5 étaient inférieurs à la limite de détection de la technique dans les deux conditions de culture (Résultats non montrés). L'ARN viral a été détecté dans les cellules à J1 (1,69 +/- 0,92 log copies/ng d'ARN total), en revanche à J5 la détection était négative.

La détection positive d'ARN entéroviral dans les cellules de la rate et la moelle osseuse de souris inoculées avec CV-B4 E2, nous a incités à déterminer si les monocytes et les macrophages de ces animaux étaient infectés.

Les rates ont été récupérées 7 jours après l'inoculation de CV-B4 E2 à des souris. La cytométrie en flux a permis de mettre en évidence que la proportion de cellules CD14+ et F4/80+ était 14 +/- 2% et 8,7 +/- 1,3% (n=3) respectivement parmi les splénocytes de souris infectées et 12,5 +/- 2,1% et 12,1 +/- 1,6% (n= 3) parmi les splénocytes de souris contrôles.

Les splénocytes ont été isolés et les cellules CD14 positives ainsi que les cellules F4/80 positives ont été sélectionnées à l'aide d'un trieur de cellules marquées par fluorescence. Dans les cellules ainsi isolées la présence d'ARN entéroviral a été recherchée.

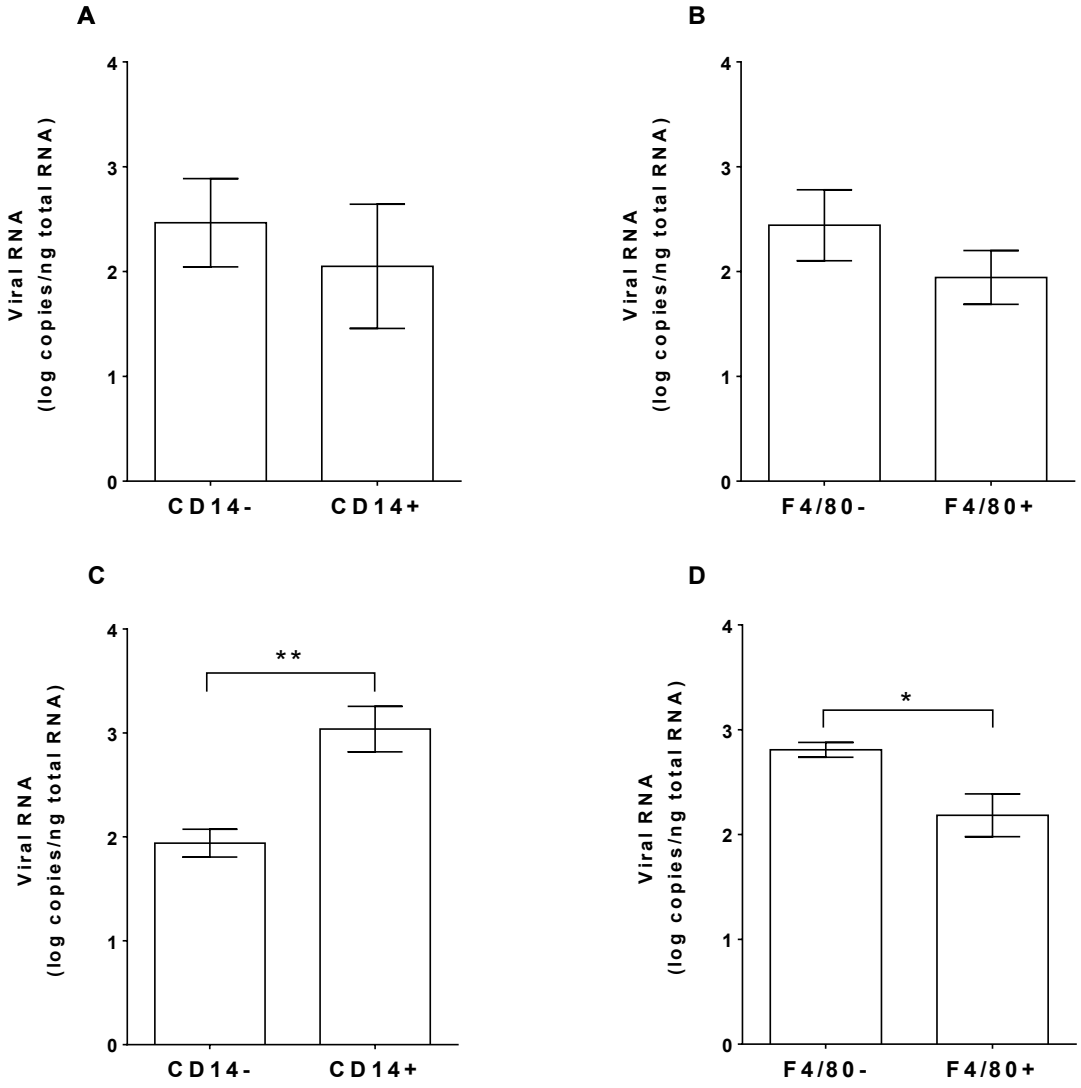

Figure 13: L'ARN entéroviral est détecté dans les cellules CD14+ et les cellules F4/80+ isolées de la rate de souris infectées par CV-B4 E2. Les souris inoculées avec CV-B4 E2 par voie intra-péritonéale, ont été sacrifiées 7 jours p.i. et leurs rates ont été récupérées et traitées en vue d'isoler les cellules CD14+ (A) et les cellules F4/80+ (B) grâce à un trieur de cellules marquées par fluorescence. Les cellules ont été isolées également à l'aide de billes magnétiques associées à des anticorps spécifiques anti-CD14 (C) et anti-F4/80 (D). Dans ces cellules la quantité d'ARN entéroviral a été déterminée par RT-qPCR, les résultats sont exprimés en log du nombre de copies d'ARN par ng d'ARN total. Les moyennes +/- écart-types de 3 expériences indépendantes sont présentées.

L'ARN entéroviral a été détecté dans les cellules CD14+ et CD14- (2,46 *vs* 2,05 log copies/ng d'ARN total) ainsi que dans les cellules F4/80+ et F4/80- (2,44 *vs* 1,94 log copies/ng d'ARN total) (Fig. 13).

Le tri cellulaire a été appliqué à des cellules préalablement fixées au paraformaldéhyde (PFA), afin prévenir tout risque de contamination des opérateurs par le virus. Le PFA peut

altérer l'ARN, c'est pourquoi nous avons alors décidé de sélectionner les cellules à l'aide d'une autre méthode.

Les cellules CD14+ et F4/80+ ont été sélectionnées grâce à des billes magnétiques couvertes d'anticorps spécifiques puis l'ARN entéroviral intracellulaire a été quantifié par RT-qPCR.

L'ARN enteroviral a été détecté dans les cellules CD14+ à des niveaux plus élevés que dans les cellules CD14- (3,03 +/- 0,21 vs 1,94 +/- 0,13 log copies/ng ARN total p value < 0.004). L'ARN entéroviral a été détecté aussi dans les cellules F4/80+ mais à des niveaux plus faibles que dans les cellules F4/80- (2,18+/-0,20 *vs* 2,80+/-0,07 log copies/ng ARN total p value= 0.02.

2. CV-B4 E2 infecte les cellules CD14+ et les cellules F4/80+ de la rate *in vitro*

L'infection *in vitro* des splénocytes par CV-B4 E2 a été étudiée. Les cellules de la rate ont été inoculées avec une multiplicité d'infection cellulaire de 0,02 (MOI 0,02). Les cellules ont été récupérées 2 jours après l'inoculation de CV-B4 E2, pour quantifier l'ARN entéroviral intracellulaire. Les valeurs moyennes +/- écart-types obtenues étaient 0,84 +/- 0,31 log de copies d'ARN viral/ng d'ARN total (n= 3) (Fig. 14).

Les cellules CD14+ ont été isolées à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD14. De la même manière les cellules F4/80+ ont été isolées. Ces populations de cellules sélectionnées de manière positive (CD14+ et F4/80+) et de manière négative (CD14- et F4/80-) ont été inoculées avec CV-B4 E2 (MOI 0,02), après lavage les cultures ont été incubées pendant 48h. Ensuite les surnageants de culture ont été recueillis clarifiés et conservés à -80°C et les cellules ont été prélevées, et après 5 lavages l'ARN a été extrait et l'ARN entéroviral a été quantifié. L'ARN entéroviral était présent dans les cellules CD14+ (1,14 +/- 0,20 log copies d'ARN /ng ARN total n= 3) mais pas dans les cellules CD14- (p value = 0,01). L'ARN entéroviral était présent également dans les cellules F4/80+ ainsi que dans les cellules F4/80- (1,30 +/- 0,03 vs 0,82 +/- 0,06 log copies/ng d'ARN total) p value = 0,03) (Fig. 14).

Le denier surnageant de lavage des cultures cellulaires ne contenait pas d'ARN viral, ce qui indique que la détection d'ARN entéroviral dans nos expériences n'était pas dû à du virus résiduel.

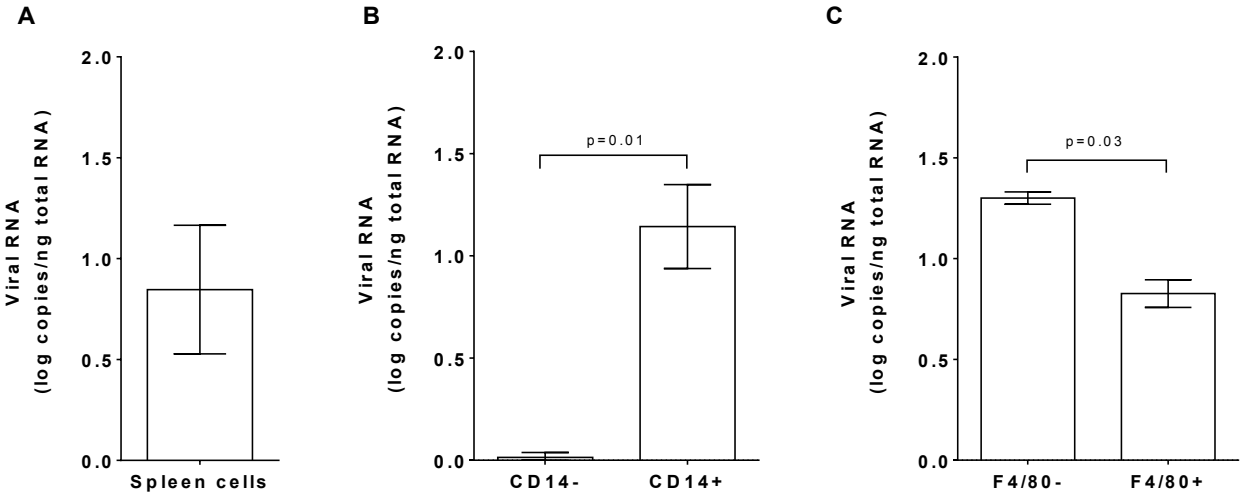

Figure 14: L'ARN entéroviral est retrouvé dans les cellules CD14+ et les cellules F4/80+ isolées de la rate de souris et inoculées avec CV-B4 E2 *in vitro*. Des souris âgées de 2 à 3 semaines ont été sacrifiées et leurs rates ont été récupérées pour isoler les splénocytes et séparer les populations cellulaires CD14+/CD14- et F4/80+/F4/80- à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques. Ces cellules ont été mises en culture et CV-B4 E2 a été ajouté (MOI = 0,02). Au bout de 48h les cellules ont été récupérées et l'ARN total a été extrait pour quantifier l'ARN entéroviral intracellulaire par RT-qPCR dans les splénocytes (A) les cellules CD14+ et CD14- (B) et les cellules F4/80 + et F4/80- (C) Les résultats sont exprimés en log du nombre de copies d'ARN viral par ng d'ARN total. Les moyennes +/- écart-types de 3 expériences indépendantes sont présentées.

Des travaux antérieurs de notre équipe, ont montré que le sérum de souris infectées par CV-B4 E2 est capable d'augmenter l'infection des cellules de la rate par le virus *in vitro* (Elmastour et al., 2016)**.** Nous avons décidé d'étudier l'infection des splénocytes et des sous-population de cellules de la rate CD14+, CD14-, F4/80+ et F4/80- par CV-B4 E2 incubé avec du sérum immun de souris.

Des souris âgées de 3 semaines ont été sacrifiées en vue de récupérer les cellules de la rate. L'infection des splénocytes par CV-B4 E2 a été facilitée quand le virus a été préalablement incubé avec le sérum de souris infectées par CV-B4 E2 (dilutions finales $1/10^3$, $1/10^4$ and $1/10^5$). En effet, les quantités d'ARN viral intracellulaire étaient 2,65+/- 0,09 à 3,77+/- 0,13 log copies/ng d'ARN total. En revanche, quand CV-B4 E2 était incubé avec le sérum de souris contrôles ou avec du milieu de culture les quantités d'ARN viral étaient

significativement plus faibles 1,22 +/- 0,07 ($p< 0,0001$) et 0,89 +/- 0.11 ($p< 0,0001$) log copies/ng d'ARN total respectivement (Fig. 14)

Les rates ont été traitées comme précédemment mentionné en vue de séparer les cellules CD14+ et CD14- et les cellules F4/80 + et F4/80-. Ces populations de cellules ont été inoculées avec CV-B4 E2 préalablement incubé avec du sérum de souris immunisées (dilution finale $1/10^3$, $1/10^4$ et $1/10^5$), du sérum de souris contrôles ou avec du milieu de culture, et ont été maintenues en culture pendant 48h. Ensuite les surnageants de culture ont été recueillis et conservés et les cellules ont été récupérées pour évaluer après lavage la quantité d'ARN viral intracellulaire. La figure 4 montre que le sérum de souris immunisées augmente l'infection des cellules CD14+. En effet les quantités d'ARN viral étaient 3,97 +/- 0,15 log copies/ng ARN total avec le sérum de souris immunisées (dilution finale $1/10^5$), valeurs supérieures à celles obtenues avec le sérum des souris contrôles (1,00 +/- 0,21 ; $p < 0,0001$) et le milieu de culture (1,13 +/- 0,25 $p = 0,0003$) respectivement. Cependant, l'incubation de CV-B4 E2 avec le sérum des souris immunisée n'a pas permis d'augmenter l'infection des cellules CD14-. Dans cette population de cellules les quantités d'ARN entéroviral étaient à la limite de détection (Fig. 15 A b).

L'incubation du virus avec le sérum immun dilué de souris infectées en comparaison avec le sérum contrôle dilué a permis d'augmenter la quantité d'ARN entéroviral dans les cellules F4/80+ (2,32 +/- 0,03 vs 0,80 +/- 0,14 log copies/ng d'ARN total ; $p < 0,032$), et encore davantage dans les cellules F4/80- (3,72 +/- 0,12 vs 1,22 +/- 0,07 log copies/ng d'ARN total ; $p < 0,005$) (Fig. 15 A c).

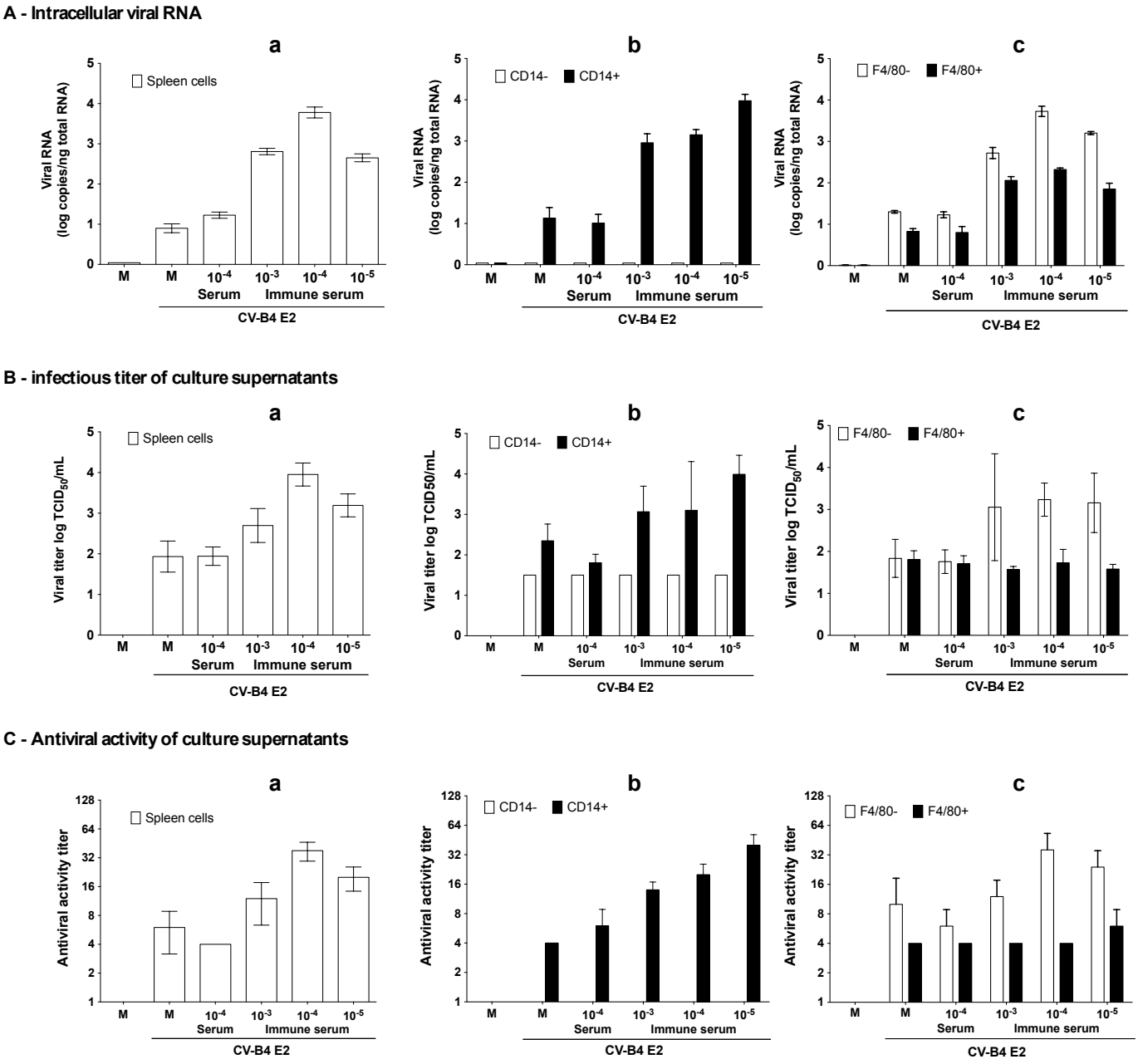

Figure 15: L'infection de populations de cellules de la rate par CV-B4 E2 *in vitro* est facilitée par le sérum de souris infectée. Les populations de cellules de la rate ont été obtenues comme décrit dans la légende de la figure 3. Les cultures de splénocytes, de cellules CD14+ et CD14-, et de cellules F4/80+ et F4/80- ont été inoculées avec CV-B4 E2 (MOI 0,02) préalablement incubé avec du milieu de culture (M), du sérum de souris contrôles (dilution finale $1/10^4$) (Serum) et du sérum immun de souris infectées par CV-B4 E2 (dilutions finales $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$), (Immune serum). Les cultures ont été incubées pendant 48 h ensuite les cellules ont été récupérées pour quantifier l'ARN entéroviral comme décrit précédemment, les résultats sont exprimés en log du nombre de copies d'ARN entéroviral par ng d'ARN total (A). Les surnageants ont été récupérés pour effectuer un titrage du pouvoir infectieux, les résultats sont exprimés en log $DICT_{50}$/ml (B). L'activité antivirale des surnageants a été testée à l'aide d'une méthode biologique. Les résultats sont l'inverse de la plus grande dilution protégeant des cultures de cellules L-929 de l'effet cytopathique induit par le virus de l'encephalomyocardite. Les moyennes +/- écart-types de 3 expériences indépendantes sont représentées.

Le titre infectieux des surnageants de culture des cellules spléniques inoculées avec CV-B4 E2 incubé avec du sérum immun à la dilution $1/10^4$ est 3,95 +/- 0,28 log $DICT_{50}$/ml alors que les titres des surnageants de culture de cellules inoculées avec le sérum de souris contrôles ou avec du milieu sont 1,94 +/- 0,22 log $DICT_{50}$/ml (p = 0,018) et 1,93 +/- 0,38 log $DICT_{50}$/ml (p = 0,032) respectivement (Fig. 15- B a).

Le titre infectieux des surnageants de culture de cellules CD14+ inoculées avec CV-B4 E2 préalablement incubé avec du sérum immun (dilution $1/10^5$) est 4 +/- 0,47 log $DICT_{50}$/ml alors que les titres des surnageants de culture de cellules inoculées avec le virus préalablement incubé avec le sérum de souris contrôles ou avec du milieu sont 1,80 +/- 0,2 (p = 0,05) et 2,30 +/- 0,4 log $DICT_{50}$/ml (p = 0,05) (Fig. 15- B b).

Le titre infectieux des surnageants de cultures de cellules CD14- inoculées avec CV-B4 en présence de sérum immun ou de sérum contrôle est à la limite de détection du test (1,5 log $DICT_{50}$/ml) (Fig. 15- B b).

Le titre infectieux des surnageants de culture de cellules F4/80- inoculées avec CV-B4 E2 préalablement incubé avec du sérum immun (dilution $1/10^4$) est 3,23 +/- 0,39 log $DICT_{50}$/ml.

Les titres des surnageants de culture de cellules inoculées avec le sérum de souris contrôles ou avec du milieu sont plus faibles mais les différences ne sont pas significatives 1,83 +/- 0,45 log $DICT_{50}$/ml (p=0,08) et 1,75 +/- 0,28 $DICT_{50}$/ml (p=0,059) respectivement.

Le titre infectieux des surnageants de cultures de cellules F4/80+ inoculées avec CV-B4 E2 préalablement incubé avec du sérum immun (dilution $1/10^4$) est 1,72 +/- 0,32 log $DICT_{50}$/ml, valeur comparable à celles obtenues avec les surnageants de cultures de cellules inoculées avec CV-B4 E2 préalablement incubé en présence de sérum de souris contrôles (1,70 +/- 0,19 log $DICT_{50}$/ml) ou de milieu (1,80 +/- 0,20 log $DICT_{50}$/ml) (Fig. 15- B c).

Les titres infectieux des surnageants de culture de cellules inoculées avec CV-B4 E2 sont après le dernier lavage 1,5 log $DICT_{50}$/ml qui est la limite de détection du test.

Les surnageants de culture des cellules spléniques inoculées avec CV-B4 E2 incubé avec du milieu (M) ou en présence de sérum contrôle (serum) ont une activité antivirale de 6 +/- 2,82 et 4 +/- 0, respectivement. Cette activité antivirale est augmentée quand CV-B4 E2 est préalablement incubé en présence de sérum immun de souris infectée par le virus. En effet, à la dilution $1/10^4$ le titre d'activité antivirale des surnageants est 38 +/- 8,48 ($p = 0,01$) (Fig. 15- C a)

Une activité antivirale a été détectée dans les surnageants de culture des cellules CD14+ inoculées avec CV-B4 E2 préalablement incubé avec du sérum immun obtenu de souris infectées par le virus. Le titre d'activité antivirale des surnageants de cultures était 40 +/- 11,3 quand CV-B4 E2 était incubé avec du sérum immun dilué à $1/10^5$. Dans les surnageants de culture de cellules CD14+ inoculées avec CV-B4 E2 le titre d'activité antivirale était 4 +/- 0. A l'opposé aucune activité antivirale n'était retrouvée dans les surnageants de culture de cellules CD14- inoculées avec le virus préalablement incubé ou non avec du sérum immun (fig. 15 – C b).

Une activité antivirale a été mise en évidence dans les surnageants de culture des cellules F4/80- inoculées avec CV-B4 E2 préalablement incubé avec du sérum immun (36 +/- 16,9 avec le sérum immun dilué à $1/10^4$). Des titres d'activité antivirale plus faibles ont été obtenus avec les surnageants de cultures de cellules F4/80+ quand CV-B4 E2 était préalablement incubé avec le sérum immun dilué à $1/10^5$ (6 +/- 2,28), le sérum non immun (4 +/- 0) ou du milieu de culture (4 +/- 0) tandis qu'aucune activité antivirale n'était détectée dans les surnageants de culture des cellules contrôles (Fig. 15 C c).

- **CV-B4 E2 infecte les cellules de la moelle osseuse *in vitro***

La moelle osseuse a été récupérée de souris âgées de 3 semaines, traitée et mise en culture comme décrit dans le chapitre matériels et méthodes. Les cellules de la moelle osseuse n'ont pas survécu dans le milieu de culture, et la majorité des cellules étaient mortes au bout de 2 jours de culture, comme l'a révélé la coloration au bleu de Trypan (Résultats non montrés). Par contre, quand les cellules étaient maintenues dans du milieu de culture contenant du M-CSF, elles restaient vivantes même au-delà de 15 jours.

Les cultures de cellules isolées de la moelle osseuse ont été inoculées avec CV-B4 E2 et après lavage, elles ont été maintenues en culture dans du milieu contenant du M-CSF pendant 10 jours. Les surnageants de culture ont été récupérés de J0 à J10 en vue d'évaluer leur titre infectieux et les cellules ont été récupérées à J1 et J10 en vue de quantifier l'ARN entéroviral intracellulaire. Le niveau des particules infectieuses a atteint 2,40 +/- 0,28 $DICT_{50}$/ml à J6 p.i. puis a diminué pour être à J10 à 1,5 log $DICT_{50}$/ml, ce qui correspond à la limite de détection de la technique (Fig. 16 A). Les quantités d'ARN entéroviral intracellulaire étaient 2,40 +/- 0,14 log copies/ng d'ARN total à J1 et 1,06 +/- 0,05 log copies/ng d'ARN total à J10 (Fig. 16 B).

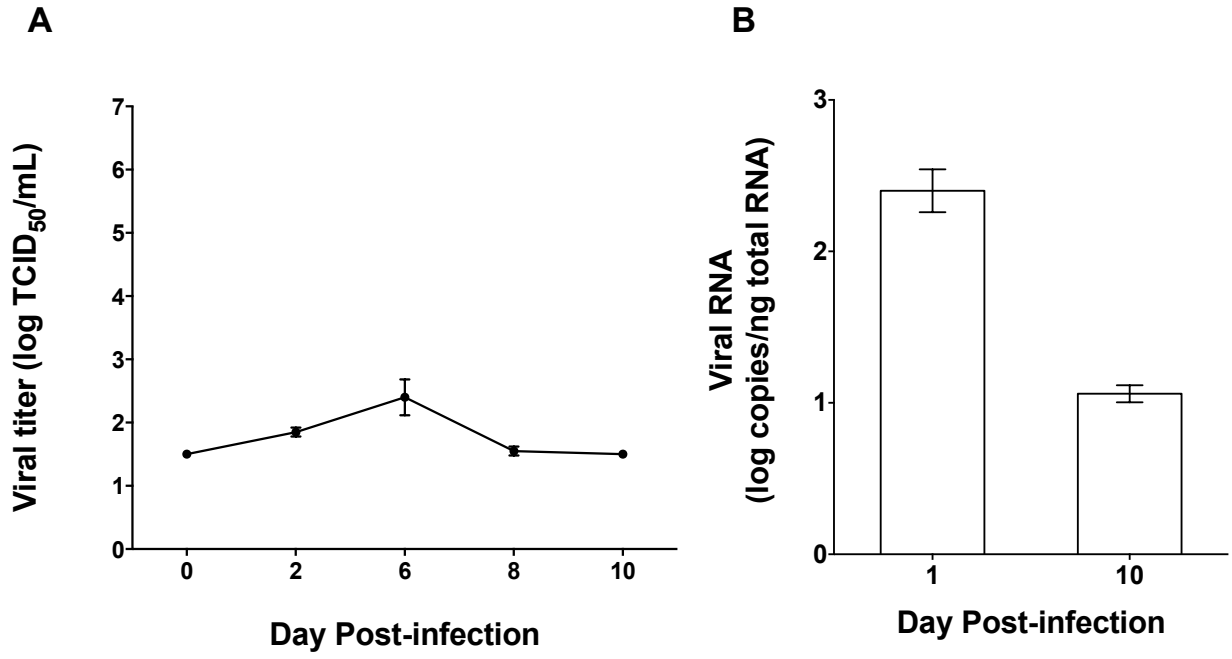

Figure 16: CV-B4 E2 infecte les cellules de la moelle osseuse *in vitro*. La moelle osseuse a été obtenue de souris âgées de 3 semaines. Les cellules de la moelle osseuse ont été inoculées avec CV-B4 E2 (MOI = 1) et maintenues en culture dans du milieu contenant du M-CSF pendant 10 jours. Le titre infectieux du surnageant de culture récupéré de J0 à J10 p.i.(A) a été déterminé et les quantités d'ARN entéroviral intracellulaire à J1 et J10 (B) ont été déterminées. Les moyennes +/- écart-types de 3 expériences indépendantes sont présentées.

D'autre part, les cellules de la moelle osseuse ont été maintenues en culture dans du milieu contenant du M-CSF pendant 10 jours avant de les inoculer avec le virus CV-B4 E2. A J10, la majorité des cellules (98%) de cette culture correspondent à des macrophages (Bone marrow derived macrophages (BMDM) car elles expriment les deux marqueurs CD11b+ et F4/80+ comme l'a montré l'analyse fluorocytométrique (Fig. 17). Au 10ème jour, les cultures de BMDM ont été inoculées avec CV-B4 E2 et après lavage, les cellules ont été maintenues

pendant 5 jours en culture dans du milieu contenant du M-CSF. Le niveau des particules infectieuses dans le surnageant de culture a atteint 5,25+/- 1,06 log DICT50/ml à J2, puis a diminué pour être 1,5 log $DICT_{50}$/ml (la limite de détection de la technique) à J5 p.i.. A J5 p.i. le titre infectieux du surnageant était à la limite de détection du test, cependant, l'ARN entéroviral était détecté, la valeur moyenne était 1,63 +/- 0,29 log copies/ng d'ARN total (Fig. 16).

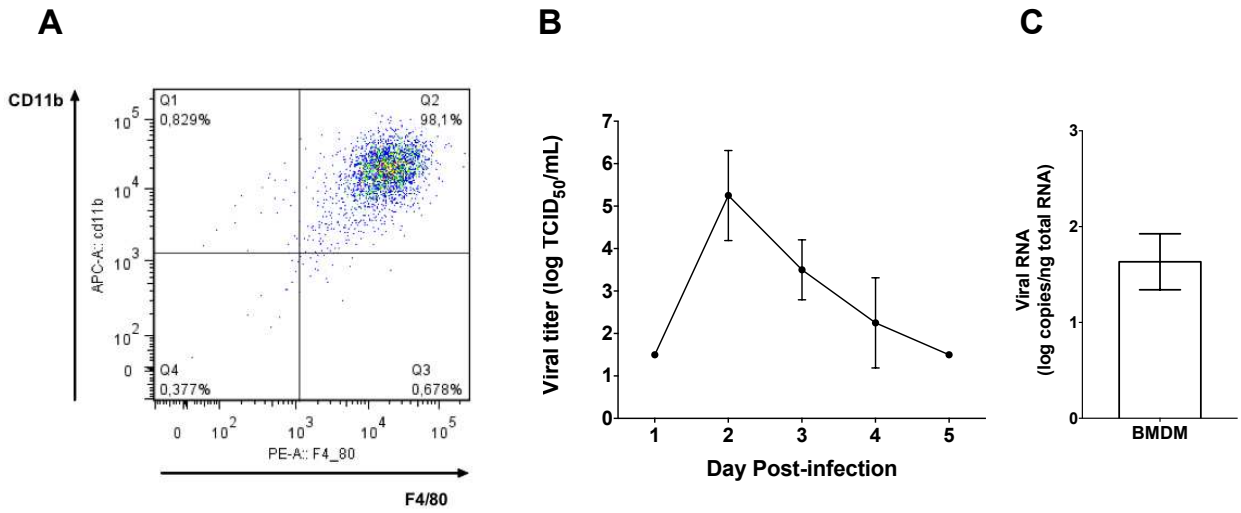

Figure 17: CV-B4 E2 infecte les cellules de la moelle osseuse différenciées en macrophage *in vitro*. La moelle osseuse a été obtenue de souris âgées de 3 semaines. Les cellules de la moelle osseuse ont été maintenues en culture dans du milieu contenant du M-CSF pendant 10 jours afin de les différencier en macrophages (BMDM). A J10, les cellules sont récupérées puis marquées avec des anticorps anti-F4/80 (PE) et anti-CD11b (APC) et analysées par cytométrie en flux (A). CV-B4 E2 est inoculé à des cultures de BMDM (MOI 1) maintenues pendant 5 jours. Le niveau des particules infectieuses dans le surnageant de culture récupéré de J1 à J5 p.i. a été déterminé, (B). La quantité d'ARN viral à J5 a été déterminée par RT-PCR quantitative (C). Les moyennes +/- écart type de 3 expériences indépendantes sont présentées.

L'impact du sérum immun de souris infectées par CV-B4 E2 dans l'infection des BMDM par le virus a été étudié. Les titres infectieux des surnageants de culture de BMDM infectés par CV-B4 E2 incubé au préalable avec du sérum immun ou du sérum contrôle, ne sont pas significativement différents (résultats non montré). De même, les quantités d'ARN entéroviral intracellulaire dans les BMDM infectés par le virus pré-incubé avec le sérum immun ou le sérum contrôle, ne sont pas significativement différents à J5 p.i. (Résultats non montré).

II. Modèle murin de diabète induit par CV-B4 E2

1. Diabète induit par CV-B4E2 chez des souris traitées avec une dose sub-diabétogène de streptozotocine.

La streptozotocine (STZ) est capable d'induire un diabète chez des animaux (souris, rats, lapins et même cochon et primates). La STZ possède une activité cytotoxique spécifique vis-à-vis des cellules β du pancréas.

Nous avons décidé d'étudier le pouvoir diabétogène de CV-B4 E2 *in vivo* dans un modèle murin constitué d'individus non consanguins non susceptibles de développer un diabète. Dans ce modèle les animaux ont été exposés à une faible quantité de STZ non diabétogène et ils ont été ensuite inoculés avec CV-B4 E2.

La streptozotocine a été solubilisée dans un tampon de citrate de sodium (pH 4,5) et administrée par voie intrapéritonéale à différentes concentrations à des souris ICR-CD1 males de 3 semaines. Nous avons ainsi déterminé la dose sub-diabétogéne de STZ ne provoquant pas d'hyperglycémie qui est de 35 mg/kg alors que la dose diabétogène est de 45 mg/kg et plus.

Nous avons par la suite utilisé cette dose de STZ pour étudier l'effet combiné de la STZ et de CV-B4 E2 chez les souris. Des souris ayant reçu 35 mg de STZ/kg sont inoculées 12j plus tard avec CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$) (Fig. 18 A). Des souris contrôles ne reçoivent que du tampon citrate de sodium à la place de la STZ d'une part et du milieu de culture à la place du virus d'autre part (Fig. 18 B), un autre groupe de souris reçoit du tampon citrate de sodium à la place de la STZ et ensuite le virus (Fig. 18 C) et un troisième groupe contrôle reçoit la STZ et ensuite du milieu de culture (Fig. 18 D).

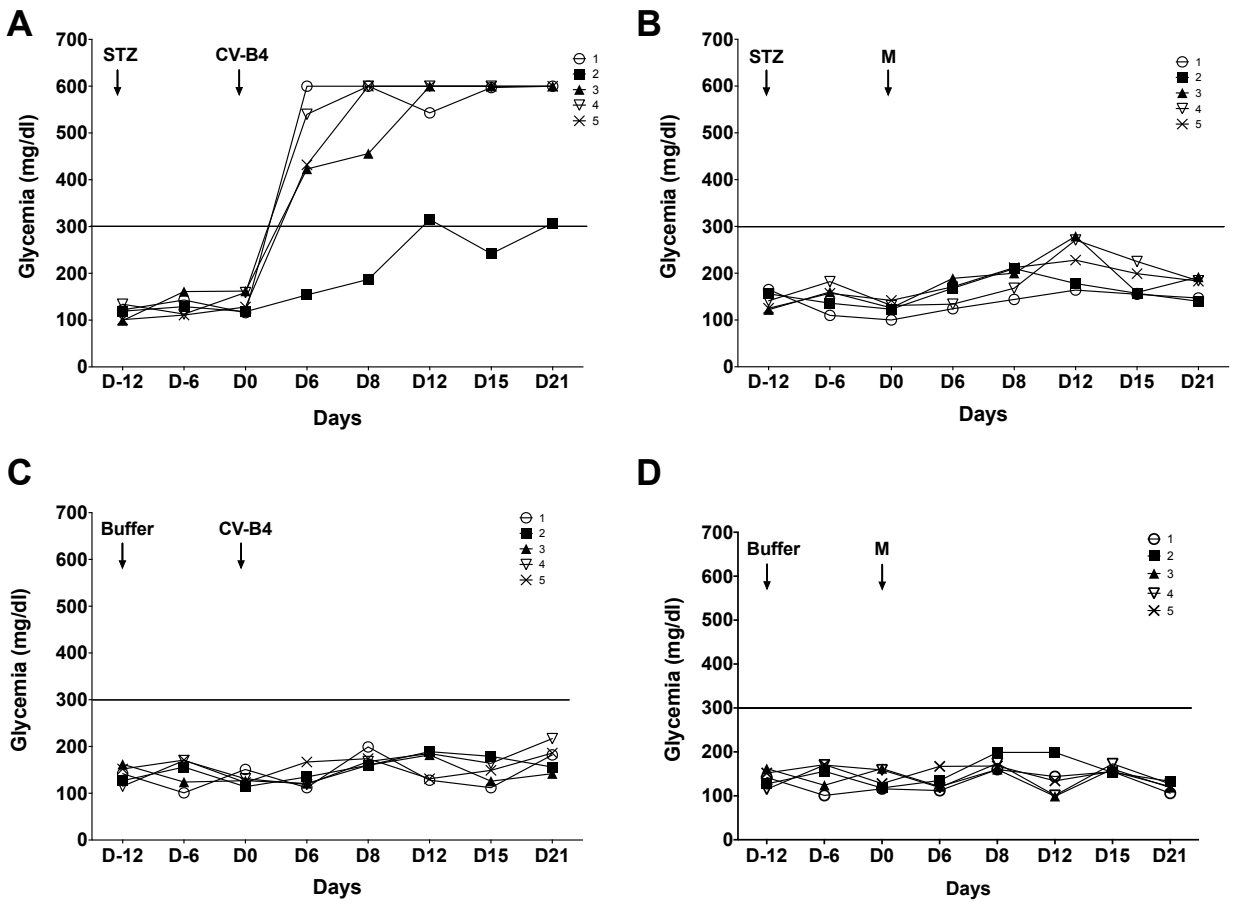

Figure 18: Suivi individuel des taux sanguins de glucose chez des souris. 5 souris ICR-CD1 ont reçu par voie intrapéritonéale (i.p.) 35 mg de STZ (A et B) ou du tampon (Buffer) (C et D) puis 12 jours plus tard CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$) ou du milieu de culture (M) a été inoculé par voie i.p. Une goutte de sang a été prélevée à la veine caudale régulièrement du jour de l'injection de STZ ou de tampon (Buffer) jusqu'à 21 jours suivant l'inoculation de CV-B E2 ou de milieu. Le taux de glucose sanguin est mesuré à l'aide d'un glucomètre. Les résultats sont exprimés en mg/dl.

La glycémie chez des souris contrôles ayant reçus du milieu de culture, du virus ou une dose sub-diabétogéne de STZ est inférieure à 300 mg/dl (seuil). Cependant, l'inoculation de CV-B4 E2 à des animaux ayant reçus la STZ entraine le développement d'une hyperglycémie. En effet, chez 4 souris sur 5 des valeurs de glycémie allant de 423 à 600 mg/dl et plus (600 mg/dl étant la limite haute de détection du test) ont été mesurées 6 j après l'inoculation du virus. La glycémie chez une souris est 300 mg/dl 12 j post-inoculation.

A 21 j post-inoculation, les souris sont sacrifiées et le pancréas et le sang sont récupérés. La recherche de particules infectieuses (par la méthode des plages de lyse) à partir de fragments de pancréas était négative (résultat non montré). Par contre la présence d'ARN entéroviral dans les fragments de pancréas a été mise en évidence.

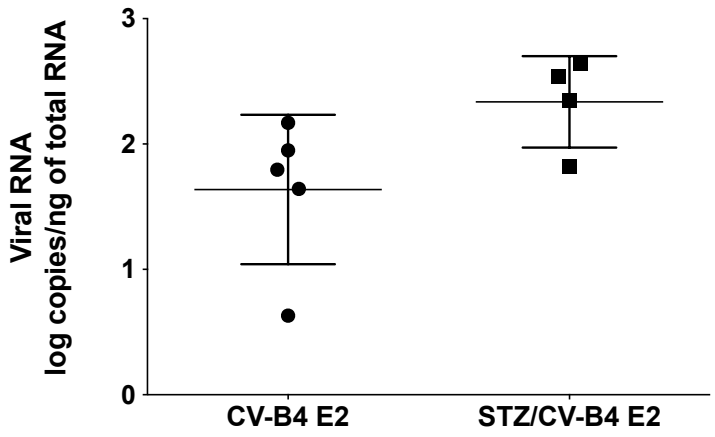

Figure 19: Quantification d'ARN entéroviral dans le pancréas de souris. Des souris ICR-CD1 ayant reçu de la STZ (35 mg/Kg) (n= 5) ou du tampon (n= 5) par voie IP sont infectées 12 j plus tard avec CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$) par voie IP. A 21 j p.i. les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et le pancréas est prélevé pour rechercher l'ARN viral par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en log de copies par ng d'ARN total.

L'ARN entéroviral est détecté dans les pancréas de souris exposées ou non à la STZ puis inoculées avec CV-B4 E2. Chez les souris inoculées avec CV-B4 E2 le taux d'ARN entéroviral dans le pancréas est 1,63 +/- 0,59 log copies/ng d'ARN total et chez les souris exposées au préalable à la STZ le taux d'ARN entéroviral dans le pancréas est 2,33 +/- 0,36 log copies/ng d'ARN total (Fig. 19). La différence entre les valeurs moyennes de ces deux groupes de souris n'est pas statistiquement significative.

Nous avons ainsi mis en œuvre un modèle de diabète induit en associant une dose sub-diabétogéne de STZ n'altérant pas l'homéostasie du glucose suivie de l'administration d'un inoculum viral qui induit une hyperglycémie.

Des souris ICR-CD1 males de 3 semaines ont été exposées ou non à la STZ à dose sub-diabétogéne (35 mg/Kg) puis 12 j plus tard CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$) a été inoculé aux animaux. Les souris ont été sacrifiées à J5, J10, J15, J20 et J25 post-infection pour récupérer le pancréas ainsi que le sang. La glycémie a été mesurée dans une goutte du sang prélevé. Le sang est centrifugé et le sérum récupéré pour déterminer la concentration d'insuline à l'aide d'une méthode ELISA.

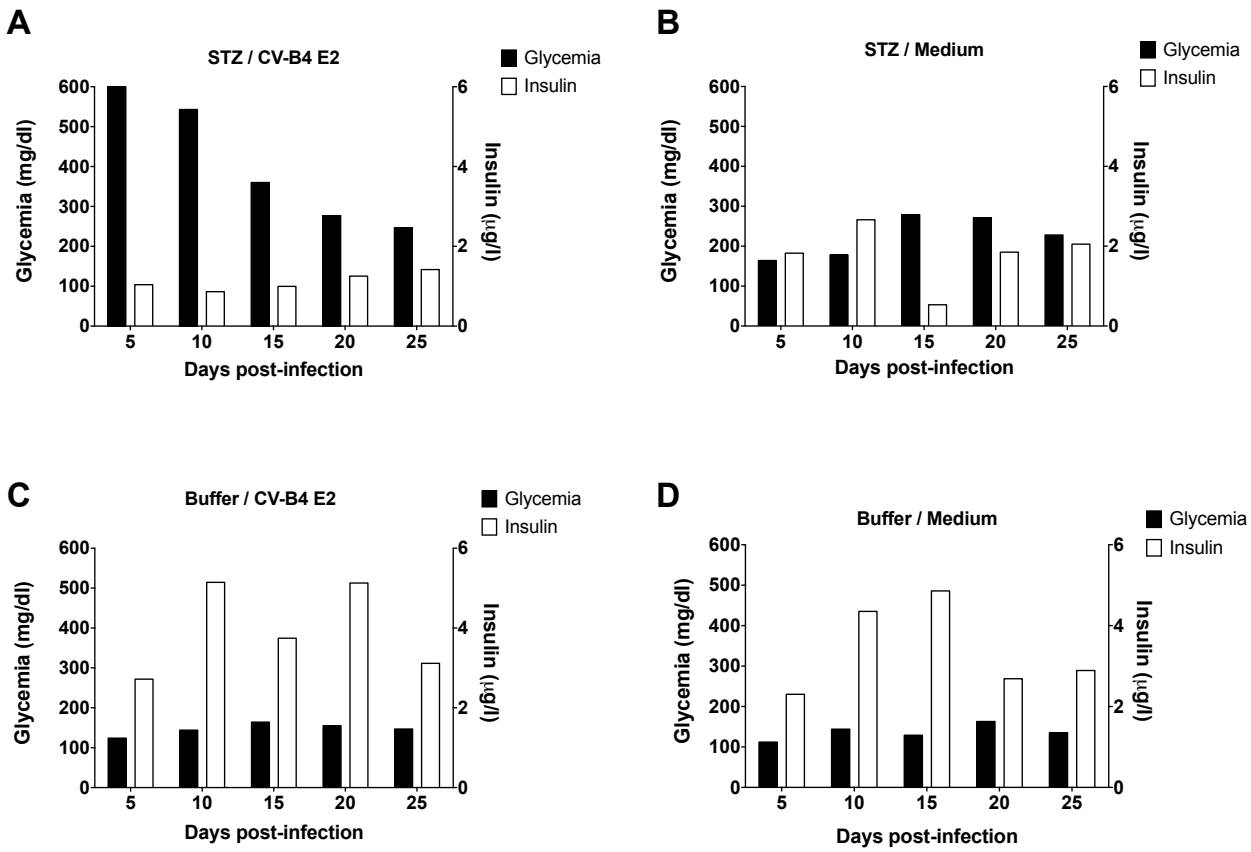

Figure 20: Diabète induit chez des souris traitées par streptozotocine puis infectées par CV-B42. Des souris ayant reçues de la STZ ou du tampon puis inoculées 12 jours plus tard avec CV-B4 E2 ou du milieu de culture ont été sacrifiées 5 (D5), 10 (D10), 15 (D15), 20 (D20) et 25 (D25) jours post-infection pour mesurer la glycémie et l'insuline. Une souris de chaque groupe a été sacrifiée au jour p.i. indiqué.

Les glycémies des souris contrôles n'ayant reçues que du milieu de culture ainsi que celles des souris infectées avec CV-B4 E2 sont comprises entre 112 et 164 mg/dl et les taux d'insuline sérique sont 2,30 à 5,14 µg/l. Chez les souris ayant reçu de la STZ, les glycémies à J15, J20 et J25 sont un peu plus élevées (de 164 à 279 mg/dl) par rapport à celles des souris contrôles mais elles ne dépassent pas le seuil de 300 mg/dl et les taux d'insuline sanguine compris entre 0,53 à 2,66 µg/l sont plus faibles par rapport à ceux des souris contrôles. Chez Les souris ayant reçu de la STZ puis infectées 12 j plus tard avec CV-B4 E2, les glycémies et les concentrations d'insuline sont respectivement 600 mg/dl et 1,03 µg/l à J5, 543 mg/dl et 0,86 µg/l à J10, 360 mg/dl et 0,23 µg/l à J15. Chez les souris sacrifiées à J20 et J25 les glycémies sont 277 et 246 mg/dl et les concentrations d'insuline sont 1,25 et 1,41 µg/l respectivement (Fig. 20).

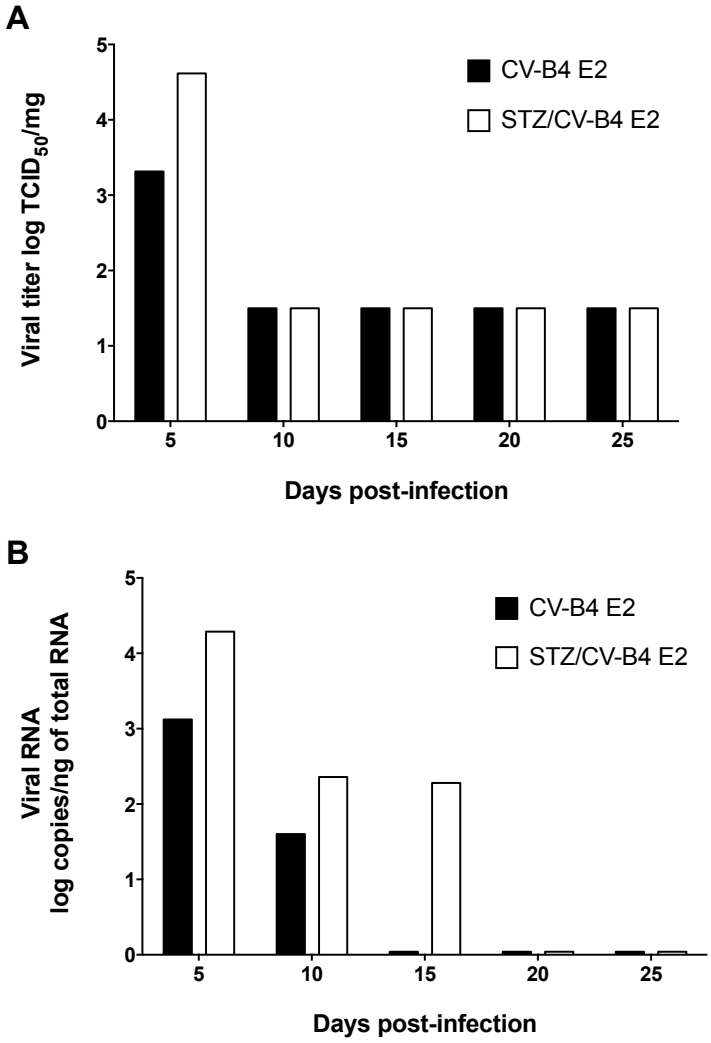

Figure 21: Des particules infectieuses et de l'ARN viral sont détectés dans le pancréas de souris inoculées avec CV-B4 E2. Les souris ont reçu de la STZ ou du tampon par voie intrapéritonéale puis elles ont été inoculées 12 j plus tard avec CV-B4 E2, ensuite à J5, J10, J15, J20 et J25 post-infection une souris est sacrifiée et le pancréas est prélevé pour rechercher les particules infectieuses par la méthode des plages de lyse, les résultats sont exprimés en PFU/mg (A), et l'ARN viral par RT-PCR quantitative, les résultats sont exprimés en log de copies d'ARN viral par ng d'ARN total (B).

Des particules infectieuses ont été retrouvées à J5 p.i. dans le pancréas de souris infectées avec CV-B4 E2 préalablement traitées ou non avec STZ (4,61 log $DICT_{50}$/mg et 3,31 log $DICT_{50}$/mg respectivement). A J10, J15, J20 et J25 p.i. la détection de particules infectieuses dans le pancréas des deux groupes de souris était négative (Fig. 21 A).

L'ARN entéroviral a été retrouvé dans le pancréas prélevé chez des souris préalablement traitées ou non avec la STZ, les valeurs obtenues étaient respectivement : 3.10^4 et $1{,}5.10^3$ log copies/ng d'ARN total à J5 post-infection ; $3{,}5.10^2$ et 6.10^1 log copies/ng d'ARN total à J10 post-infection ; $1{,}8.10^2$ et 0 log copies/ng d'ARN total à J15 post-infection. Dans les pancréas

prélevés au-delà de J15 post-infection, l'ARN viral était indétectable chez les souris traitées ou non avec STZ (Fig. 21 B).

2. Impact de CV-B4E2 sur le pancréas de souris traitées avec une dose sub-diabétogéne de streptozotocine.

Dans notre modèle murin de diabète induit par la streptozotocine associée à CV-B4 E2 *in vivo*, une hyperglycémie et une hypoinsulinémie sont mises en évidence dès le 5^{ième} jour post-infection. Nous avons donc décidé d'évaluer l'impact du virus dans ce modèle par l'étude de la charge virale du pancréas, par la recherche de marqueurs inflammatoires et par une analyse histologique chez des animaux au 5ième jour post-infection.

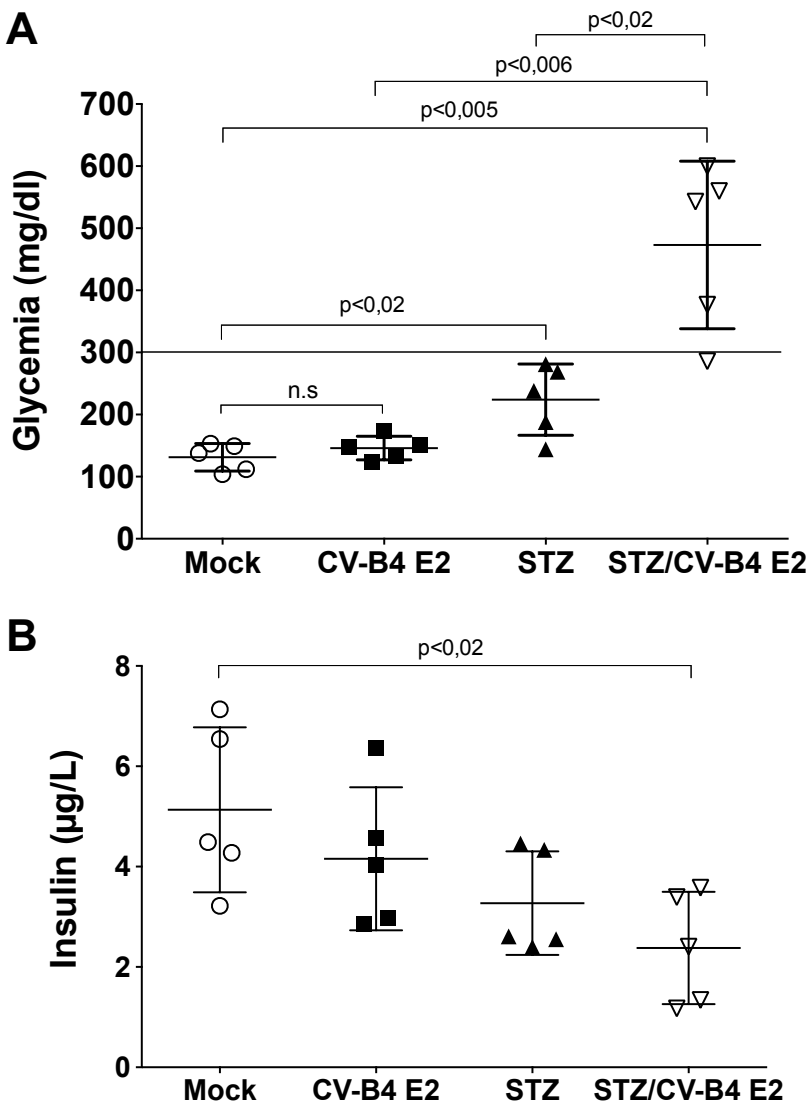

Figure 22: La combinaison de STZ et CV-B4 E2 induit une hyperglycémie accompagnée d'une hypoinsulinémie. Des souris ICR-CD1 ont été traitées avec STZ (35mg/kg) puis 12 j plus tard ont été inoculées avec CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$) (STZ/CV-B4 E2) ou ont été traitées avec du tampon ou la STZ puis inoculées avec du milieu de culture (Mock et STZ respectivement) ou avec CV-B4 E2 (CV-B4 E2). Les animaux ont été sacrifiés au 5ième jour post-infection et la glycémie (A) et l'insulinémie (B) ont été déterminées à l'aide d'un glucomètre et d'une méthode ELISA respectivement. n = 5 dans chaque groupe. n.s. : non significatif.

La figure 22 montre que chez les souris traitées par STZ puis infectées, la glycémie est augmentée et l'insulinémie est diminuée par rapport aux valeurs obtenues chez les animaux contrôles. La glycémie est plus élevée chez les souris traitées par STZ (224 +/- 57,37 mg/dl) par rapport aux souris inoculées avec le tampon puis avec le milieu de culture (131,20 +/- 22,06 mg/dl) mais les valeurs sont significativement plus faibles que celles obtenues chez les souris traitées par STZ puis infectées (473,20 +/- 134,9 mg/dl $p < 0.02$). Dans ce groupe 4 souris sur 5 présentent une glycémie supérieure à 300 mg/dl.

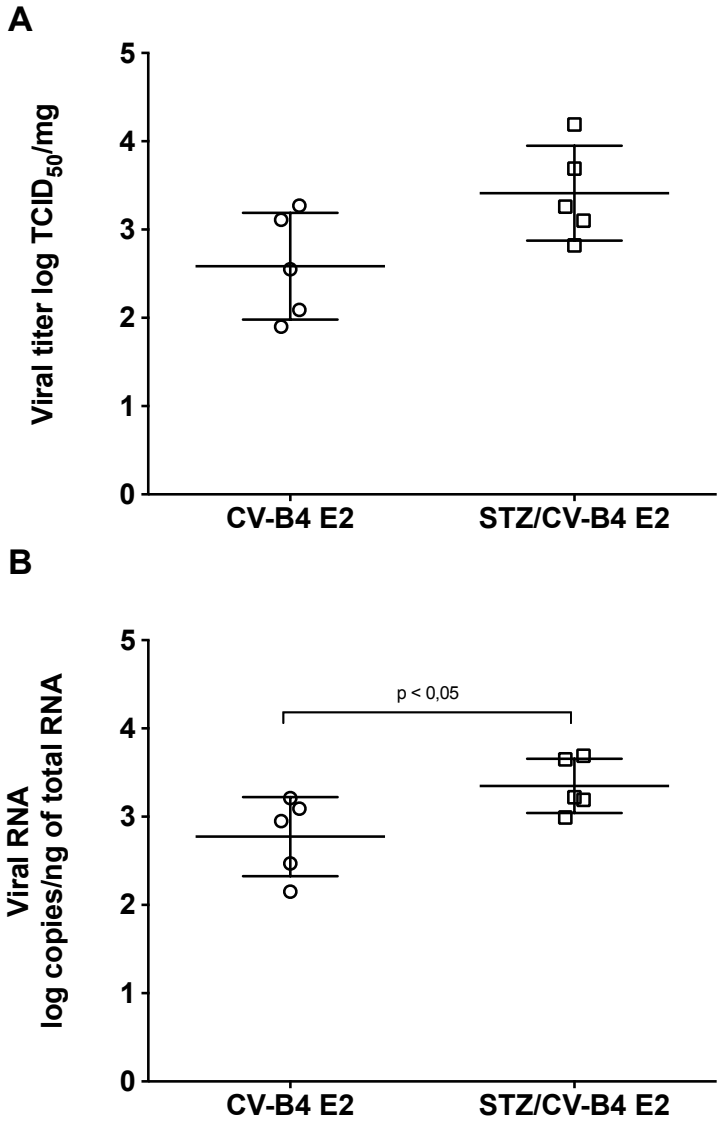

Figure 23: Particules infectieuses et ARN viral sont retrouvés dans le pancréas de souris diabétiques. Les souris ICR-CD1 traitées ou non avec de la STZ puis inoculées avec CV-B4 E2 ont été sacrifiées à 5 j p.i. et leurs pancréas ont été prélevés et broyés, le titre infectieux du tissu est déterminé les résultats sont exprimés en log $DICT_{50}$/mg et le taux d'ARN entéroviral dans les tissus est quantifié par RT-PCR en temps réel, les résultats sont exprimés en log du nombre de copies d'ARN entéroviral /ng d'ARN total. n = 5 dans chaque groupe.

Le pancréas a été prélevé. Le tissu pancréatique a été préparé pour rechercher la présence de particules infectieuses et d'ARN entéroviral. Des particules infectieuses ont été détectés dans le pancréas de souris inoculées avec CV-B4 E2 (2,58 +/- 0,60 log $DICT_{50}$/mg) et dans le pancréas de souris ayant reçues la STZ puis CV-B4 E2 (3,41 +/- 0,53 log $DICT_{50}$/mg). L'ARN entéroviral est également retrouvé dans le pancréas des souris inoculées avec CV-B4 E2 (2,77 +/- 0,44 log copies par ng d'ARN total) et dans le pancréas des souris traitées avec

STZ puis inoculées avec CV-B4 E2 (3,34 +/- 0,30 log copies par ng d'ARN total). La valeur moyenne dans ce groupe STZ/CV-B4 E2 est plus élevée que celle obtenue avec les pancréas des animaux inoculés avec CV-B4 E2 ($p < 0,05$) (Fig. 23).

L'impact d'une dose sub-diabétogéne de STZ et de CV-B4 E2 sur le tissu pancréatique de souris a été étudié. L'IP10, l'IFNγ et le TNFα sont des marqueurs d'inflammation. L'IP10 est produit par les cellules β pancréatiques (Frigerio et al., 2002). Nous avons décidé d'évaluer la réponse inflammatoire du pancréas en mesurant les concentrations tissulaires de TNFα, d'IFNγ et d'IP10 et d'effectuer une analyse histologique de l'organe.

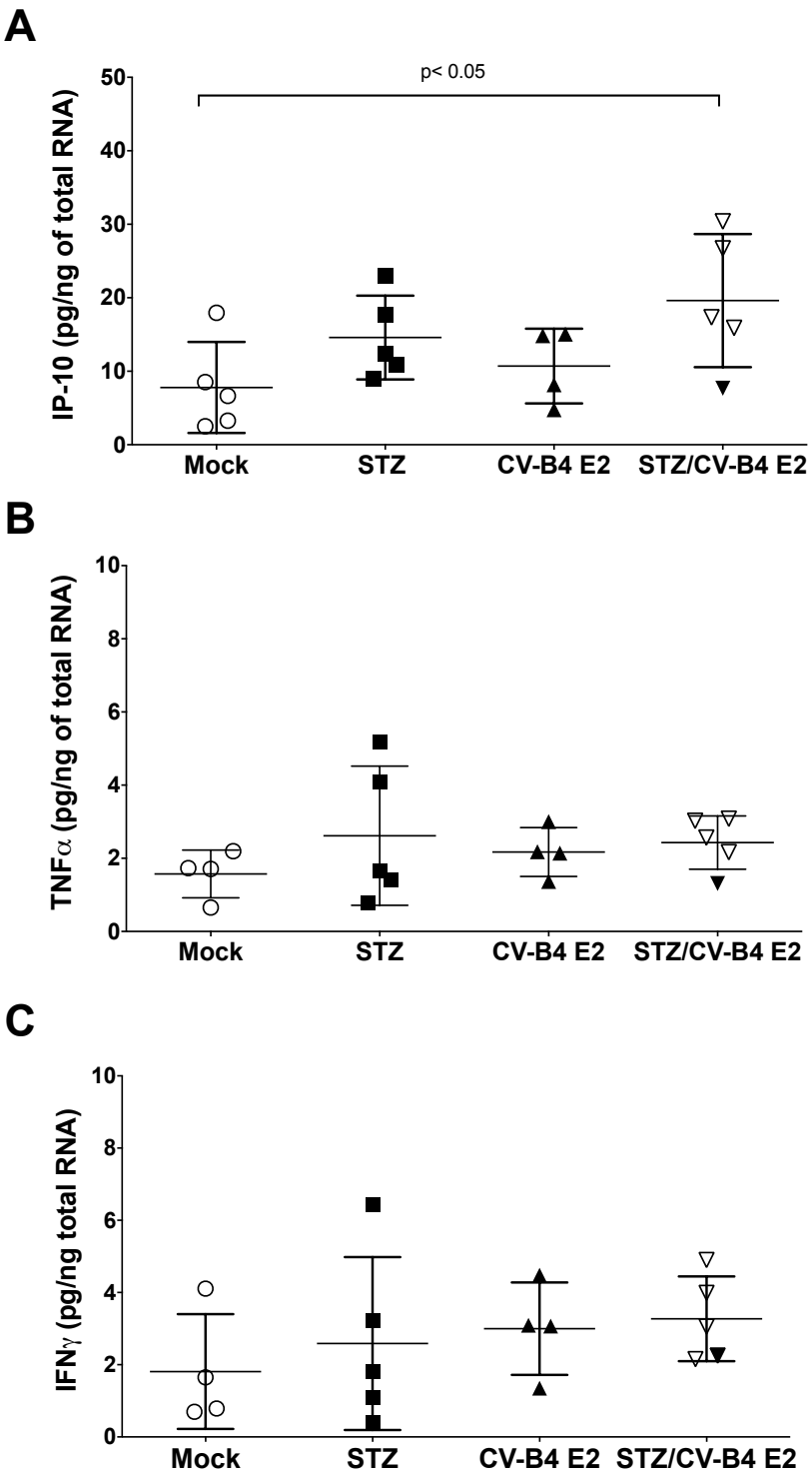

Figure 24: Cytokines inflammatoires détectées dans le pancréas de souris inoculées avec STZ et CV-B4 E2. Des souris ICR-CD1 ont été traitées avec STZ (35mg/kg) puis 12 j plus tard ont été inoculées avec CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$) (STZ/CV-B4 E2) ou ont été traitées avec du tampon ou la STZ puis inoculées avec du milieu de culture (Mock et STZ respectivement) ou avec CV-B4 E2 (CV-B4 E2). Les animaux sont sacrifiés à J5 post inoculation et le pancréas est prélevé puis broyé en présence d'inhibiteurs de protéase afin de quantifier l'IP-10 (A), le TNFα (B) et l'IFNγ (C) par méthode ELISA. Les résultats sont exprimés en pg par ng d'ARN total. La moyenne +/- écart-types est présentée, n=5 dans chaque groupe.

Dans le pancréas de souris contrôles, le TNFα et l'IFNγ sont détectés. Dans le pancréas des souris traitées par STZ ou inoculées avec CV-B4 E2 les moyennes des concentrations de TNFα et IFNγ tissulaire ne sont pas significativement différentes de celles obtenues à partir des pancréas des animaux contrôles. Chez les souris ayant reçu STZ et CV-B4 E2 les moyennes des concentrations de TNFα et d'IFNγ dans le tissu pancréatique ne sont pas significativement différentes de celles obtenues à partir des pancréas des autres groupes d'animaux (fig. 24).

Dans le pancréas de souris contrôles, l'IP10 est détecté (7,8 +/- 6,2 pg/ng d'ARN total). Dans les pancréas des souris traitées par STZ ou inoculées avec CV-B4 E2 la moyenne des concentrations d'IP10 tissulaire est plus élevée mais la différence n'est pas statistiquement significative (14,6 +/- 5,7 et 10,71 +/- 5,08 pg/ng d'ARN total respectivement). Dans le groupe des 5 souris ayant reçu STZ et CV-B4 E2 la moyenne des concentrations d'IP-10 dans le tissu pancréatique est supérieure à celles obtenues à partir des pancréas des autres groupes d'animaux (19,7 +/- 8,9 pg/ng d'ARN total) (fig. 7). Dans ce groupe chez la souris avec une glycémie inférieure à 300 mg/dl la concentration d'IP10 est la plus faible (7,70 pg/ng d'ARN total), chez les 4 autres souris de ce groupe avec une glycémie > 300 mg/dl, la moyenne des concentrations d'IP-10 est 22,6 +/- 7 pg/ng d'ARN total ($p = 0.016$ vs mock) (Fig. 24 A).

Une partie du pancréas prélevé chez les animaux sacrifiés, a été immédiatement récupérée dans du formol tamponné afin de fixer l'organe. Les tissus ont ensuite été inclus dans des blocks de paraffine. Une fois coupées, les sections ont été déparaffinées puis colorées (hématoxyline et éosine).

L'analyse histologique du pancréas des 5 souris ayant reçues la STZ puis CV-B4 E2 permet de mettre en évidence un infiltrat inflammatoire du tissu exocrine et autour d'ilots de Langerhans chez une souris (STZ / CV-B4 E2 M1), une involution adipeuse chez deux autres souris (STZ / CV-B4 E2 M2 et M3) et une altération marquée du tissu endocrine chez une autre souris (STZ / CV-B4 E2 M4). L'analyse histologique du pancréas de la souris de ce groupe dont la glycémie était < 300 mg/dl n'a pas mis en évidence d'altération (Fig. 25).

Les souris contrôles ayant reçues du tampon et du milieu de culture et les souris ayant reçues la STZ ou inoculées avec CV-B4 E2 présentent des ilots de Langerhans intacts.

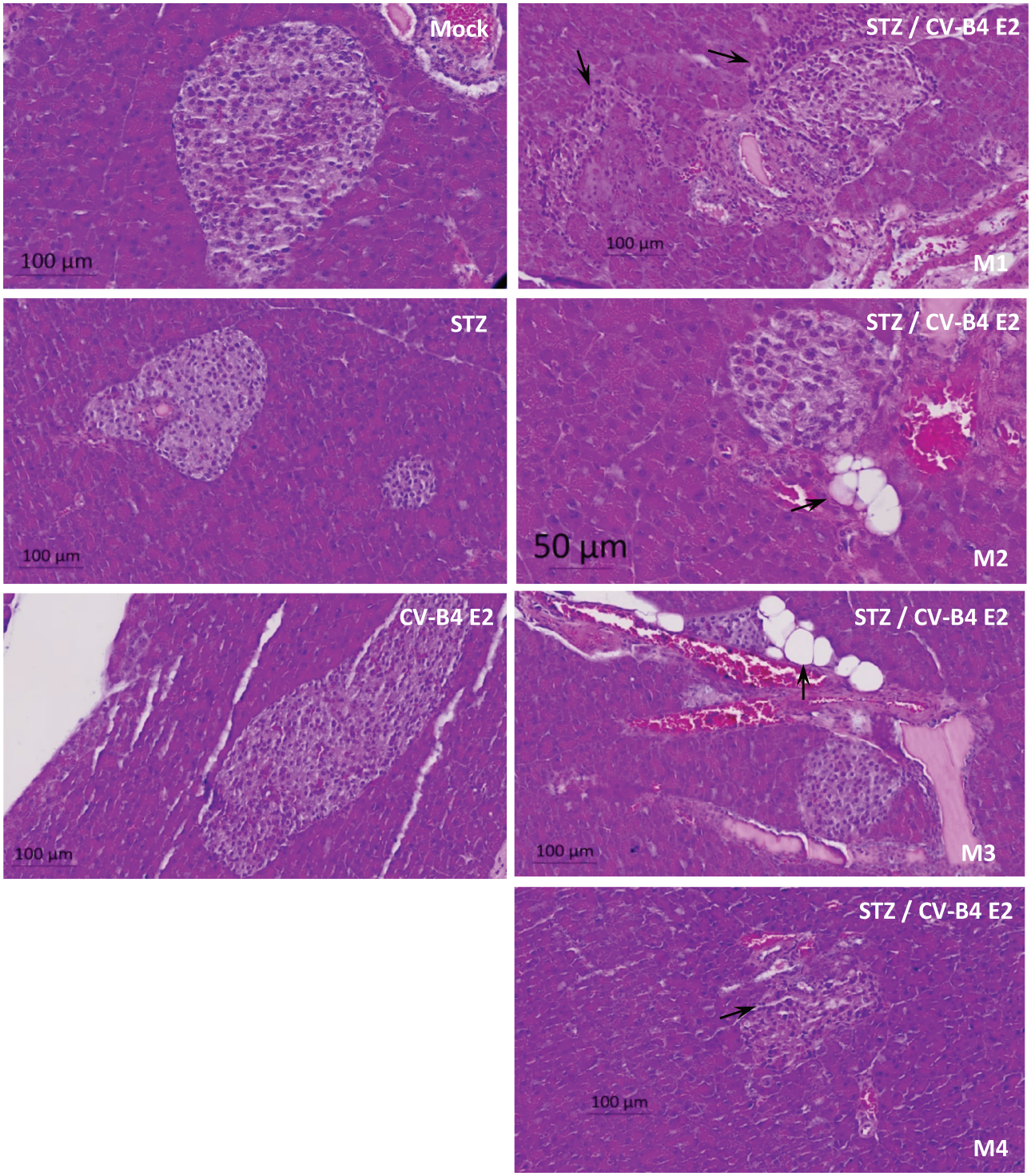

Figure 25: Altérations du pancréas chez des souris exposées à la streptozotocine et inoculées avec CV-B4 E2. Des souris ICR-CD1 ont été traitées avec STZ (35mg/kg) puis 12 j plus tard ont été inoculées avec CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$) (STZ/CV-B4 E2) ou ont été traitées avec du tampon ou la STZ puis inoculées avec du milieu de culture (Mock et STZ respectivement) ou avec CV-B4 E2 (CV-B4 E2). Les animaux sont sacrifiés à J5 post inoculation et leurs pancréas recueillis dans du formol tamponné et puis traités comme indiqué dans la section matériels et méthodes pour analyse histologique. Les coupes ont été analysées à l'aide du scanner Zeiss Axioscan (Z1). L'analyse individuelle du pancréas de 4 souris diabétiques (STZ / CV-B4 E2 Mouse (M)1 à M4) est présentée. Les flèches montrent les lésions tissulaires, infiltrat inflammatoire (M1), involution adipeuse (M2 et M3) et altération marquée du tissu endocrine (M4).

L'administration de STZ à faible dose ou de CV-B4 E2 n'a pas induit d'hyperglycémie chez des souris ICR CD1. Par contre l'administration de STZ à faible dose suivie de l'inoculation de CV-B4 E2 a provoqué une hyperglycémie associée à une hypoinsulinémie. Dans le tissu pancréatique de ces animaux diabétiques de même que dans celui des souris ayant reçu soit STZ soit CV-B4 E2, il a été retrouvé une concentration d'IP10 plus élevée que chez les souris contrôles.

L'hypoinsulinémie observée chez des animaux traités avec STZ puis inoculés avec CV-B4 E2 indique que la fonction des cellules bêta pancréatiques productrices d'insuline a été altérée chez ces individus.

Nous avons étudié *in vitro* l'effet de la STZ et de CV-B4E2 sur des cellules bêta pancréatiques murines sécrétrices d'insuline (lignée Min-6). Dans ce modèle la viabilité des cellules a été déterminée et dans les surnageants de culture le titre infectieux et les concentrations d'IP-10 et d'insuline ont été mesurés.

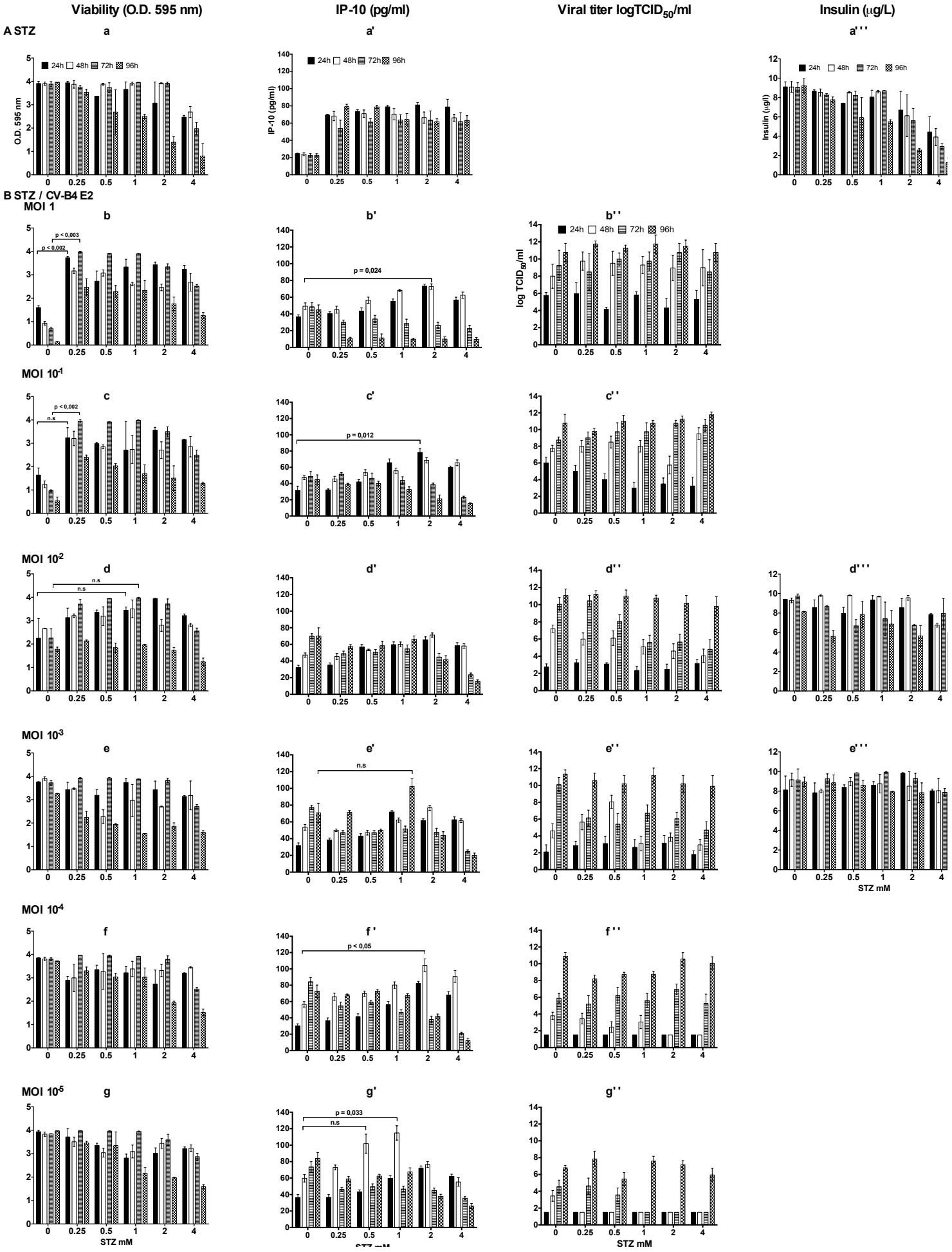
Viability (O.D. 595 nm)
IP-10 (pg/ml)
Viral titer logTCID50/ml
Insulin (µg/L)
A STZ
a
a'
a''
B STZ / CV-B4 E2
MOI 1
b
b'
b''
MOI 10-1
c
c'
c''
MOI 10-2
d
d'
d''
d'''
MOI 10-3
e
e'
e''
e'''
MOI 10-4
f
f'
f''
MOI 10-5
g
g'
g''
24h 48h 72h 96h
O.D. 595 nm
IP-10 (pg/ml)
log TCID50/ml
Insulin (µg/l)
p < 0,003
p < 0,002
p = 0,024
p = 0,012
n.s
p < 0,05
p = 0,033
STZ mM

Figure 26 : Impact de la streptozotocine et de CV-B4 E2 sur des cellules β pancréatiques murines. 10^5 cellules beta pancréatiques (lignée Min-6) sont distribuées dans des micropuits. Les cellules sont incubées 24h avec du milieu en absence ou en présence de concentrations croissantes de STZ (0,25 - 4 mM) (A). Ensuite CV-B4 E2 (MOI 1 à 10^{-5}) est ajouté et au bout de 2h les tapis de cellules sont lavés et les microplaques sont incubées pendant 4 jours (B). Les surnageants sont récupérés à 24, 48, 72 et 96 h pour quantifier l'IP-10 et l'insuline à l'aide d'une méthode ELISA, les résultats sont exprimés en pg/ml et µg/l respectivement et pour déterminer leur contenu en particules infectieuses évalué par titrage (les résultats sont exprimés en log $DICT_{50}$/ml). Un test de viabilité cellulaire au cristal violet est réalisé. Les résultats présentés sont la moyenne +/- écart-types de deux expériences indépendantes.

La streptozotocine diminue la viabilité cellulaire évaluée par le crystal violet dès 24h à 4mM, et au bout de 96h aux concentrations plus faibles (Fig. 26 A a).

L'effet cytopathique provoqué par CV-B4 E2 aux MOI 1, 10^{-1} et 10^{-2} est observé dès 24h p.i. ce qui a pour effet de réduire la viabilité des cellules reflétée par la diminution des DO de la coloration au crystal violet des tapis cellulaires (Fig. 26 B b, c et d avec 0 mM de STZ). CV-B4 E2 aux MOI 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5} n'altère pas la viabilité des tapis de cellules comme l'attestent les valeurs de DO comparables à celles des cellules non infectées (Fig. 26 B e, f et g avec 0 mM de STZ).

Quand CV-B4 E2 aux MOI 1, 10^{-1} et 10^{-2} est ajouté aux cellules préalablement traitées par la STZ, la viabilité est semblable à celle des cellules non infectées. Alors que la viabilité des cellules inoculées avec CV-B4 E2 à ces MOI est très faible. En effet, à la MOI 1 à 72h, la viabilité des cellules inoculées avec CV-B4 E2 est réduite, reflétée par des valeurs de DO de 0,69 +/- 0,07 alors que la viabilité des cellules traitées par STZ et CV-B4 E2 est conservée reflétée par des valeurs de DO plus élevées (3,97 +/- 0,03 ; p=0,002) **(**Fig. 26 B b).

L'addition de CV-B4 E2 aux MOI 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5} aux cultures traitées par la STZ provoque une diminution des DO obtenues après coloration au crystal violet par rapport à celle observées quand les cultures sont exposées soit au virus soit à la STZ. En effet, quand CV-B4 E2 à la MOI 10^{-4} est associé à la STZ à 0,25 mM la viabilité à 24h est diminuée, reflétée par des valeurs de DO de 2,89 +/- 0,16, alors que l'inoculation de CV-B4 E2 ou de STZ aux cultures de cellules ne s'accompagne pas à 24h d'une modification de la viabilité comme le montrent les valeurs de DO 3,85 +/- 0,004 (p=0,07 vs STZ/CV-B4 E2) et 3,93 +/- 0,05 (p=0,04 vs STZ/CV-B4 E2) respectivement proches des valeurs des contrôles (Fig. 26 B e, f, g).

Les cultures de cellules β murines inoculées avec CV-B4 E2 ont été infectées comme l'attestent les valeurs des titres infectieux des surnageants de culture. Quand CV-B4 E2 est inoculé aux MOI 1, 10^{-1} et 10^{-2} (Fig. 26 B b'', c'' et d'' avec 0 mM de STZ) les titres

infectieux des surnageants après 24h d'incubation sont 5,75 +/- 0,35, 6 +/- 0,70 et 2,75 +/- 0,34 log $TCID_{50}$/ml respectivement et après 48h aux MOI 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5} les titres infectieux surnageants de culture sont 4,6 +/- 0,84, 3,80 +/- 0,42 et 3,45 +/- 0,63 log $TCID_{50}$/ml respectivement (Fig 26 Be'', f'' et g'') La préincubation des cellules avec STZ avant l'inoculation de CV-B4 E2 n'a pas d'effet sur les valeurs des titres infectieux des surnageants.

Les cellules β murines de la lignée Min-6 sécrètent de l'IP-10, les concentrations retrouvées dans les surnageants de culture sont d'environ 25 pg/ml. L'administration de STZ, aux cultures induit une augmentation de la production d'IP-10 qui atteint un plateau d'environ 80 pg/ml dès la plus faible concentration (0,25 mM) (Fig. a'). L'inoculation de CV-B4 E2 aux cultures de cellules Min-6 induit la sécrétion d'IP-10. La concentration d'IP-10 à 72h dans les surnageants de culture de cellules inoculées avec CV-B4 E2 aux MOI 1 et 10^{-1} est plus faible que celle obtenue dans le surnageant de culture des cellules inoculées avec les MOI inférieures (MOI 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5}) La quantité d'IP-10 présente dans les surnageants est corrélée à la viabilité des cellules Min-6. En effet, avec CV-B4 E2 à la MOI 1 à 72h, la viabilité est réduite (DO 0,69 +/- 0,07) par rapport à celle obtenue à la MOI 10^{-5} (DO 3,84 +/- 0,002) (Fig. 26 B c', d', e', f' et g').

La quantité d'IP-10 produite par les cellules Min-6 inoculées avec CV-B4 E2 varie en fonction de la MOI et de la viabilité. En effet, la quantité d'IP-10 à 72h augmente lorsque la MOI diminue, les valeurs sont 48,55 +/- 4,87, 48,79 +/- 5,95, 69,81 +/- 3,10, 77,31 +/- 2,38, 84,36 +/- 5,14 et 73,51 +/- 6,35 pg/ml pour les MOI 1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} et 10^{-5} respectivement. La viabilité augmente avec ces MOI décroissantes, les valeurs de DO sont 0,69 +/- 0,07, 0,97 +/- 0,03, 2,25 +/- 0,40, 3,71 +/- 0,09, 3,80 +/- 0,05 et 3,84 +/- 0,002 respectivement.

Les concentrations d'IP-10 dans les surnageants de culture des cellules Min-6 traitées par l'association de STZ et de CV-B4 E2 ne sont pas significativement différentes de celles obtenues dans les surnageants de culture traitées soit par la STZ soit par CV-B4 E2 aux MOI 1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} et 10^{-4}. Par contre les concentrations d'IP-10 dans les surnageants de culture de cellules Min-6 traitées avec la STZ (1mM) puis inoculées avec CV-B4 E2 (MOI 10^{-5}) sont plus élevées que celles obtenues dans les surnageants de cultures de cellules traitées avec STZ ou inoculées avec CV-B4. Dans les surnageants de cultures de cellules exposée à la STZ (1mM) et au CV-B4 E2 (MOI 10^{-5}) les concentrations d'IP-10 sont 114,8 +/- 8,7 pg/ml à 48h p.i. Dans les surnageants de cultures de cellules exposée à la STZ (1mM) ou au CV-B4 E2

(MOI 10^{-5}) les concentrations d'IP-10 sont 70,4 +/- 6,4 pg/ml (p = 0,03) et 59,79 +/- 4,54 pg/ml (p = 0,03) respectivement à 48h p.i..

La quantité d'insuline dans les surnageants de culture des cellules Min-6 diminue à 96h en présence de STZ à toutes les concentrations (Fig. 26 A a'''). En effet, dans les surnageants de culture les cellules Min-6 à 96h la concentration d'insuline est 9,2 +/- 0,72 µg/L, tandis que dans les surnageants de culture les cellules Min-6 incubées avec la STZ à 0,25, 0,5, 1, 2 et 4 mM les concentrations d'insuline sont décroissantes : 7,77 +/- 0,28, 5,90 +/- 2,09, 5,49 +/- 0,20, 2,56 +/- 0,17 et 1,26 +/- 0,45 µg/L respectivement.

Les concentrations d'insuline dans les surnageant de culture de cellules Min-6 inoculées avec CV-B4 E2 aux MOI 10^{-2} et 10^{-3}, restent proches de 9 µg/L qui est la valeur retrouvée dans les surnageants de culture de cellules contrôles.

L'inoculation de CV-B4 E2 aux MOI 10^{-2} et 10^{-3} aux cellules Min-6 traitées par la STZ induit une sécrétion d'insuline plus élevée que lorsque les cellules sont traitées avec STZ. Ces valeurs plus élevées d'insuline sont probablement le reflet d'une libération de l'hormone, car elle sont obtenues dans les surnageants de culture de cellules traitées par STZ puis CV-B4 E2 à la MOI 10^{-2} dont la viabilité à 96h est réduite par rapport aux contrôles.

III. Lutte anti-entérovirale

Les entérovirus sont des virus non enveloppés, à ARN simple brin positif appartenant à la famille des *Picornaviridae*. Cette grande famille comprend de nombreux agents pathogènes qui sont impliqués dans une large gamme de manifestations cliniques, affectant aussi bien les animaux que les humains. On estime que les entérovirus causent chaque année 10 à 15 millions d'infections symptomatiques souvent bénignes. Les entérovirus peuvent également être impliqués dans des pathologies, telles que pancréatite, méningite, encéphalite et myocardite.

Un vaccin pour lutter contre un entérovirus non poliomyélitiques, entérovirus 71, est en phase III en chine. Il n'existe pas de vaccin pour lutter contre d'autres entérovirus non poliomyélitiques.

Un espoir de lutte contre les entérovirus repose sur des molécules de synthèse à activité antivirale. Des molécules inhibent la traduction d'ARN viral (Quinacrine) (Tan et al., 2014) ou l'ARN polymérase (Favipiravir) (Furuta Y. et al., 2013), ou encore la réplication de l'ARN viral (Ribavirine). Des molécules se fixent sur la capside et empêche ainsi l'attachement comme le pirodavir (Lacroix C. et al., 2015) ou inhibent la décapsidation comme le pleconaril (Lacroix C. et al., 2015). Récemment, la fluoxétine, un inhibiteur de la réabsorption de la sérotonine a été identifié comme un inhibiteur de la réplication des entérovirus *in vitro* (Ulferts et al., 2013; Zuo et al., 2012).

L'effet anti-CV-B4 E2 de la fluoxétine a été mis en évidence par notre équipe dans une lignée de cellules pancréatiques humaines. Cet effet a été observé dans un modèle de cellules béta pancréatiques humaines chroniquement infectées par CV-B4 E2.

Nous avons étudié l'activité anti-CV-B4 E2 de molécules dérivées de pirodavir et de pleconaril (Laconi et al., 2011), et du favipiravir dans des modèles de lignées cellulaires humaines et de la fluoxétine dans un modèle de cellules beta pancréatiques murines.

1. Etude de l'activité anti-CV-B4 E2 des dérivés du pirodavir et du pleconaril

Le pirodavir est cytotoxique à faible dose et le pleconaril présente des effets secondaires qui ont causé l'arrêt des tests cliniques. Des dérivés de ces molécules ont été crées à partir de la structure du pleconaril et du pirodavir afin d'améliorer l'activité antivirale et de réduire leur cytotoxicité cellulaire.

Ces dérivés possèdent une activité anti-poliovirus, mais leur activité vis-à-vis d'autres entérovirus est mal connue. La capacité de ces molécules d'inhiber l'ECP induit par CV-B4 *in vitro* a été étudiée.

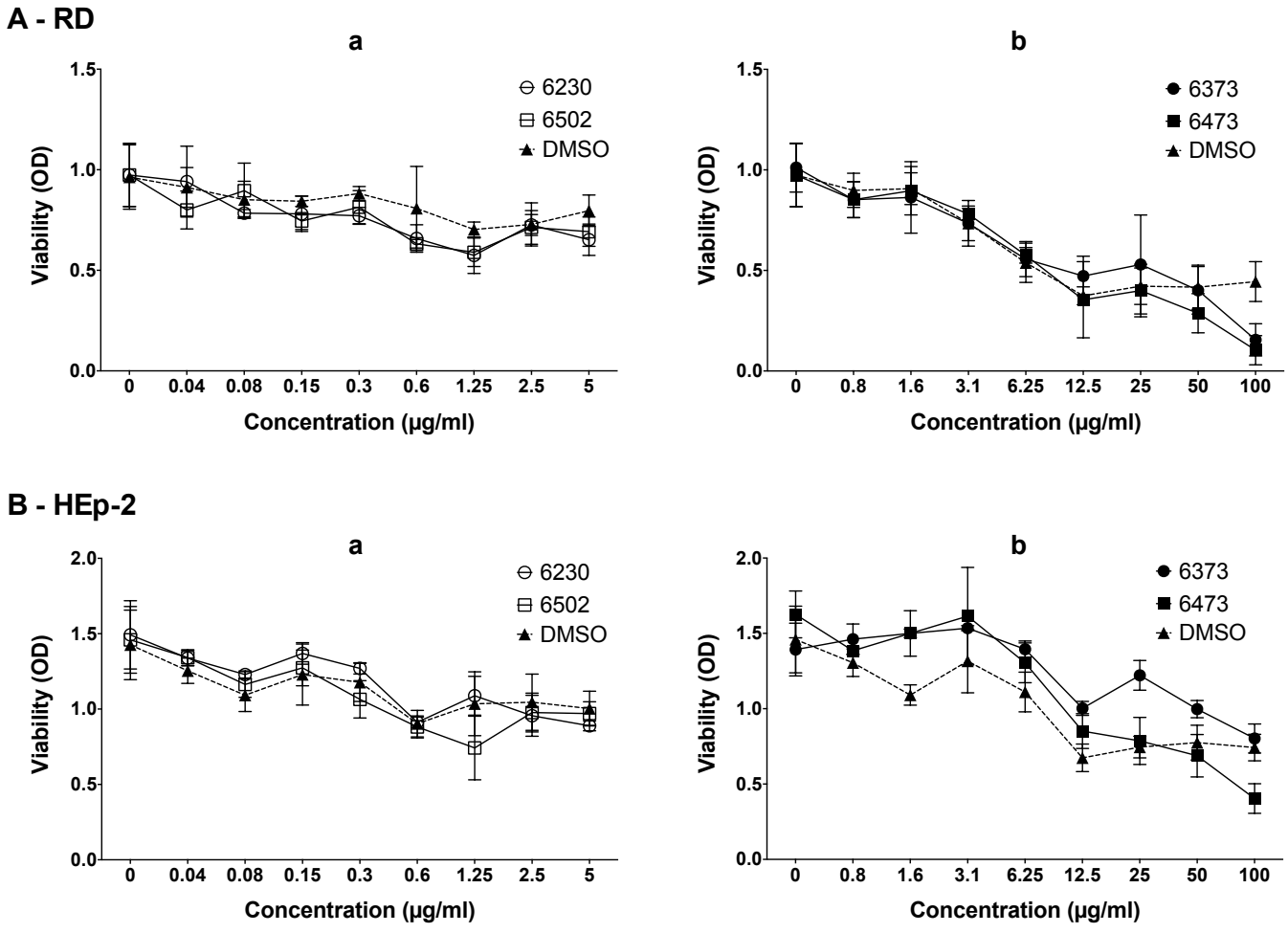

Figure 27:Viabilité des cellules RD et HEp-2 incubées en présence de molécules dérivées du pléconaril et du pirodavir. 5.10^4 cellules dans 100 µl de milieu sont distribuées dans des micropuits. 12h après, les molécules diluées dans du DMSO ou le DMSO ont été ajoutées aux cultures de cellules à différentes concentrations. Au bout de 48h d'incubation la viabilité cellulaire a été évaluée (test à l'Orangu), les

résultats sont exprimés en densité optique (OD) (lecture à 450 nm). Les résultats sont la moyenne +/- écart-types de 2 expériences indépendantes. a : Dérivés 6230 et 6502 ; b : Dérivés 6373 et 6473.

Les dérivés 6230 et 6502 ne sont pas toxiques aux concentrations 0,04 à 5 µg/ml vis-à-vis des cellules RD et HEp-2. Tandis que les dérivés 6373 et 6473 sont toxiques à partir de la concentration 12,5 µg/ml (Fig. 27 A-a et B-a).

L'activité anti-CV-B4 E2 et anti-Echovirus 7 (EV-7) *in vitro* de ces molécules a été étudiée.

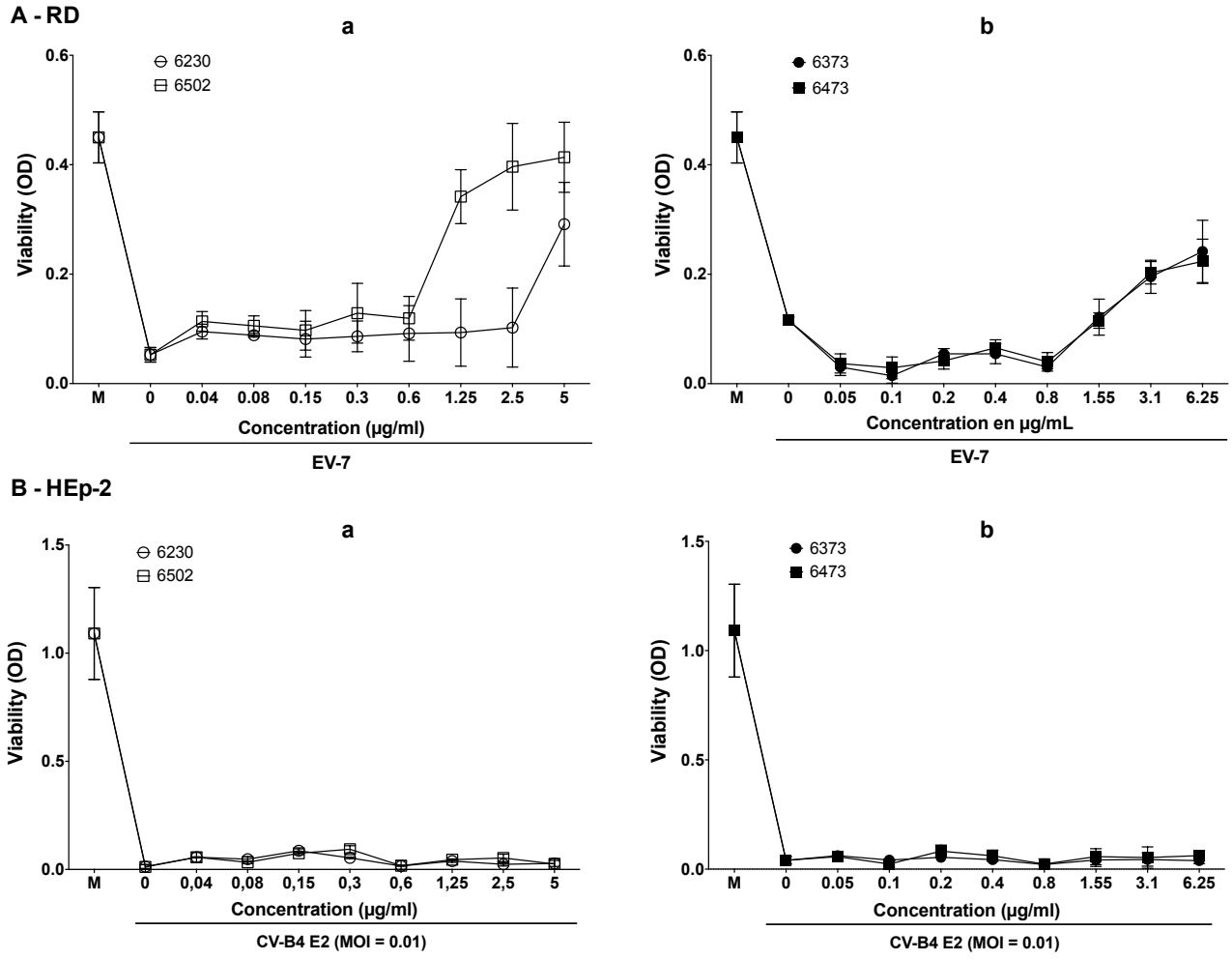

Figure 28: Activité de molécules de synthèse vis-à-vis d'EV-7 et de CV-B4 E2. 5.10^4 cellules dans 100 µl de milieu sont distribuées dans des micropuits. 12h après, les dérivés du pleconaril et du pirodavir ont été mis en contact avec des cellules RD (A) et des cellules HEp-2 (B) à différentes concentrations puis inoculées avec EV-7 ou CV-B4 E2. Au bout de 48h d'incubation la viabilité cellulaire a été évaluée (test à l'Orangu), les résultats sont exprimés en Densité Optique (lecture à 450 nm). Les résultats sont la moyenne +/- écart-types de 2 expériences indépendantes. a : Dérivés 6230 et 6502 ; b : Dérivés 6373 et 6473.

La viabilité des cellules RD infectées par EV-7 est réduite (DO : 0,05 +/- 0,01). La viabilité augmente quand les cellules infectées sont traitées avec le dérivé 6230 à la concentration 5µg/ml (DO : 0,29 +/- 0,07) mais elle est inférieure à celle obtenue avec les tapis de cellules contrôles (DO : 0,45 +/- 0,04 ; p =0,048). La viabilité augmente également quand les cellules

infectées sont traitées avec le dérivé 6502 aux concentrations 1,25, 2,5 et 5 µg/ml (DO : 0,34 +/- 0,04 (p=0,0509) ; 0,39 +/- 0,07 (p=0,38) et 0,41 +/- 0,06 (p=0,47) respectivement) (Fig. 28 A).

Les dérivés 6373 et 6473 inhibent aussi l'ECP induit par EV-7 dans les cellules RD ce qui est reflété par une augmentation de la viabilité des tapis cellulaires par rapport aux cellules infectées mais les valeurs de DO sont inférieures à celles obtenues avec le dérivé 6502 (Fig. 28 Ab)

Le dérivé 6502 inhibe l'ECP induit par EV-7, un effet de moindre intensité est également obtenu avec les autres molécules dérivées du pléconaril et du pirodavir, mais par contre aucun de ces dérivés inhibe l'ECP induit par CV-B4 E2 dans les cultures de cellules Hep-2 (Fig. 28 A a).

L'activité d'autres dérivés du Pirodavir et du Pleconaril vis-à-vis de CV-B4 E2 a été testée et comparée à leur activité vis-à-vis d'EV-11.

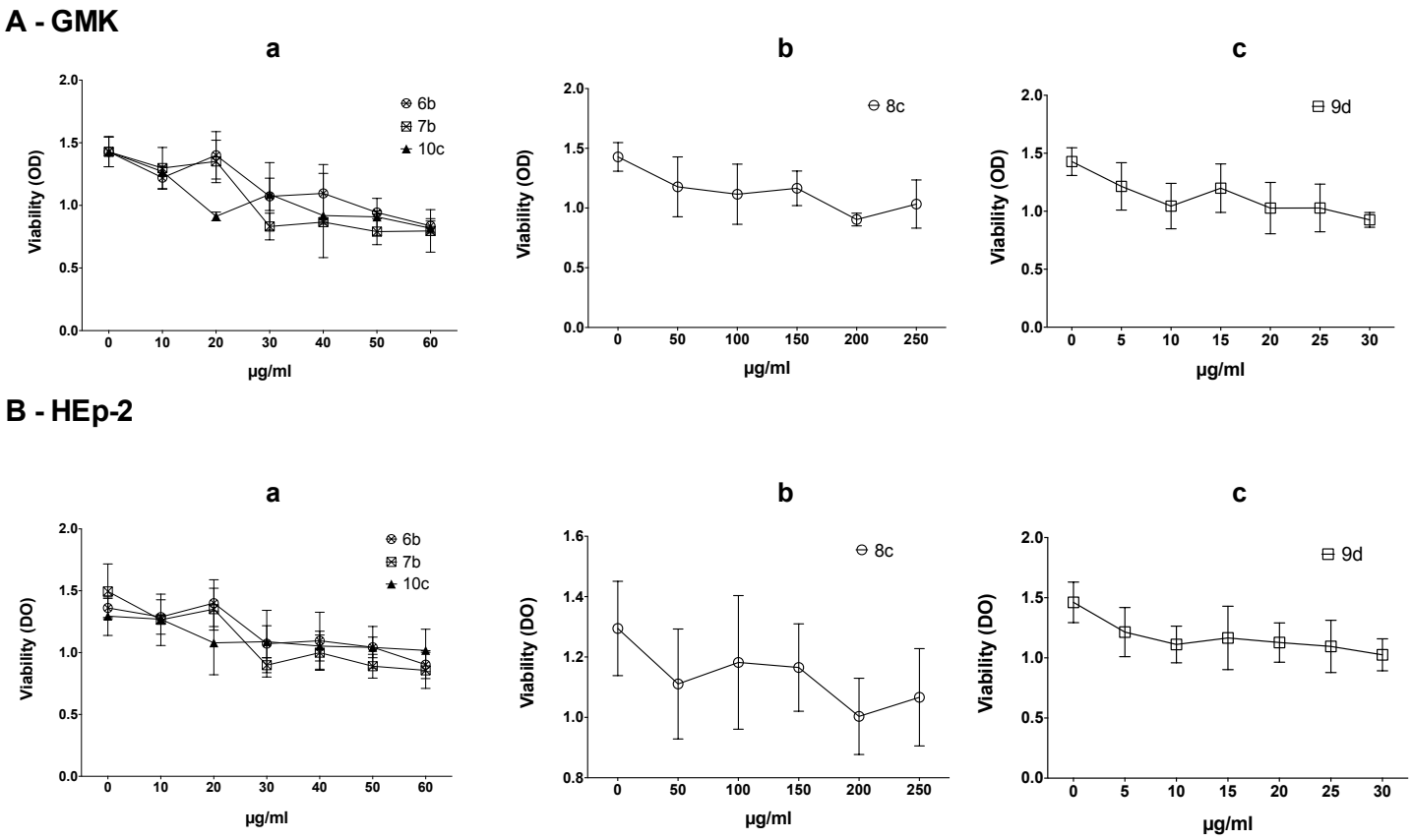

Figure 29: Viabilité des cellules RD et HEp-2 incubées en présence de molécules dérivées du pléconaril et du pirodavir. 5.10^4 cellules dans 100 µl de milieu sont distribuées dans des micropuits. 12h après, les molécules diluées dans du DMSO ou le DMSO ont été ajoutés aux cultures de cellules à différentes concentrations. Au bout de 48h d'incubation la viabilité cellulaire a été évaluée (test à l'Orangu), les résultats sont exprimés en DO (lecture à 450 nm). Les résultats sont la moyenne +/- écart-types de 2 expériences indépendantes. a : Dérivés 6b, 7b et 10c ; b : 8c ; c : 9d.

Les dérivés 6b, 7b et 10c sont toxiques à partir de la concentration 50 µg/ml. Les dérivés 8c et 9d ne présentent aucune toxicité vis-à-vis de GMK et HEp-2 (Fig. 29).

L'activité anti-CV-B4 E2 et anti-EV-11 *in vitro* de ces molécules a été testée.

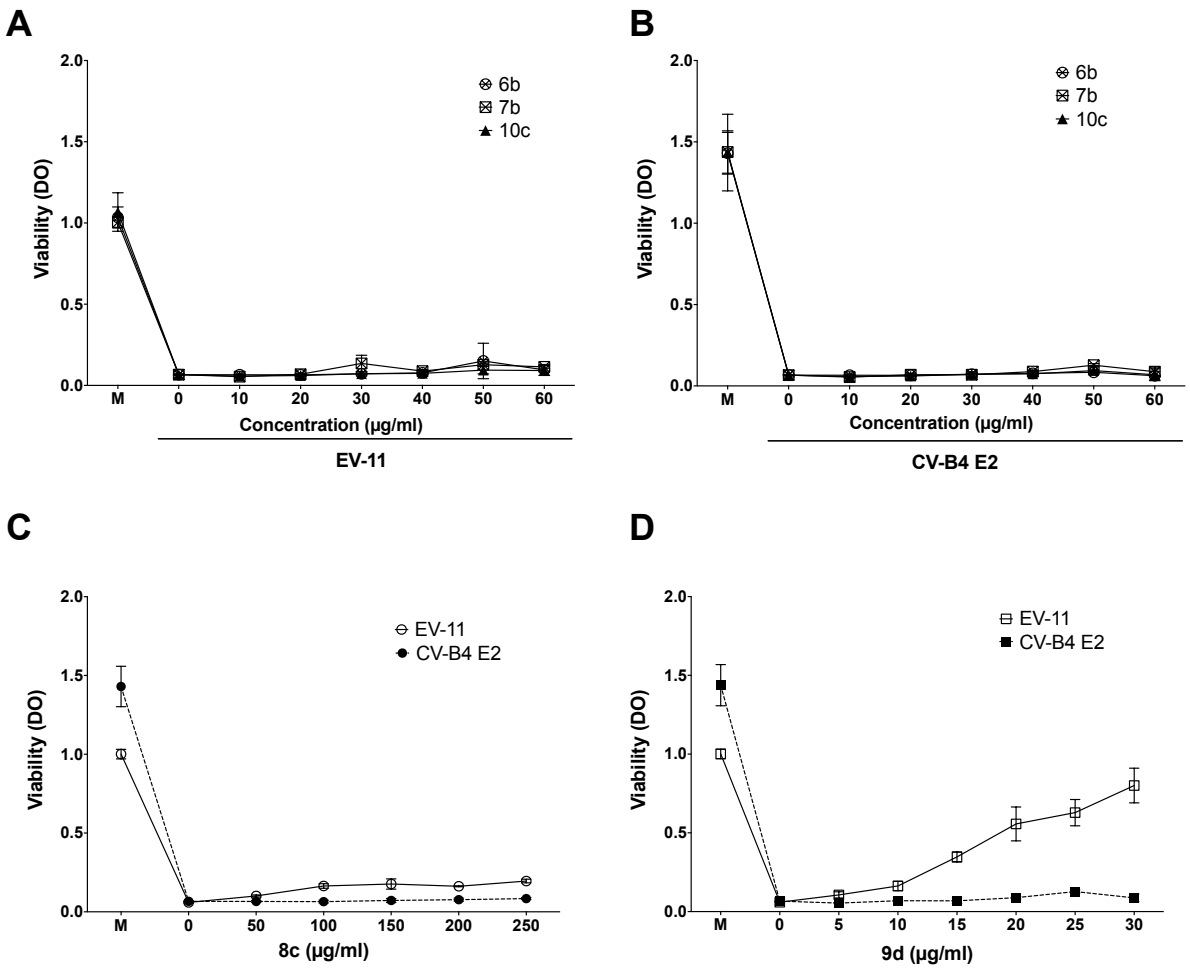

Figure 30: Activité de molécules de synthèse vis-à-vis d'EV-11 et de CV-B4 E2. 5.10^4 cellules dans 100 µl de milieu sont distribuées dans des micropuits. 12h après, les dérivés du pleconaril et du pirodavir ont été mis en contact avec des cellules GMK et des cellules HEp-2 à différentes concentrations puis inoculées avec EV-11 ou CV-B4 E2. Au bout de 48h d'incubation la viabilité cellulaire a été évaluée par l'Orangu, les résultats sont exprimés en Densité Optique (lecture à 450 nm). Les résultats sont la moyenne +/- écart-types de 2 expériences indépendantes. A) 6b, 7b et 10c testés vis-à-vis d'EV-11. B) 6b, 7b et 10c testés vis-à-vis de CV-B4 E2 C) 8c et D) 9d testés vis-à-vis d'EV-11 dans des cellules RD et vis-à-vis de CV-B4 E2 dans des cellules HEp-2.

Quand le dérivé 9d est ajouté aux cultures de cellules GMK infectées par EV-11 la viabilité des tapis de cellules est augmentée (DO : 0,80 +/- 0.11 contre 0,05 +/- 0,003 pour les cellules non traitées, p = 0,0072) et les valeurs de DO sont proches de celles obtenues avec les cellules contrôles (DO : 1,00 +/- 0,03 et p = 0,07) (Fig. 30 D). Les autres dérivés du pléconaril et du pirodavir n'ont pas d'effet dans nos expériences vis-à-vis d'EV-11 (Fig. 30 A et C).

Aucun de ces dérivés inhibe l'ECP induit par CV-B4 E2 dans des cultures de cellules HEp-2.

- **Favipiravir**

Le favipiravir connu également sous l'appellation T-705, est un inhibiteur d'ARN polymérase virale, initialement développé pour lutter contre le virus influenza mais qui possède un spectre d'action plus large. En effet, cette molécule est active *in vitro* vis-à-vis d'autres virus à ARN : alphavirus (Julander et al., 2009 ; Delang et al., 2014), arenavirus (Gowen et al., 2007 ; Mendenhall M. et al., 2011), bunyavirus (Gowen BB et al., 2007), norovirus (Rocha-pereira et al., 2012), filovirus (Smither et al., 2014), flavivirus (Julander et al., 2009a**).** L'effet du Favipiravir vis-à-vis d'entérovirus : EV-D68 (Sun et al., 2015) et poliovirus (Furuta et al., 2002) a été rapporté. Nous avons étudié l'activité du favipiravir vis-à-vis de CV-B4 E2 *in vitro*.

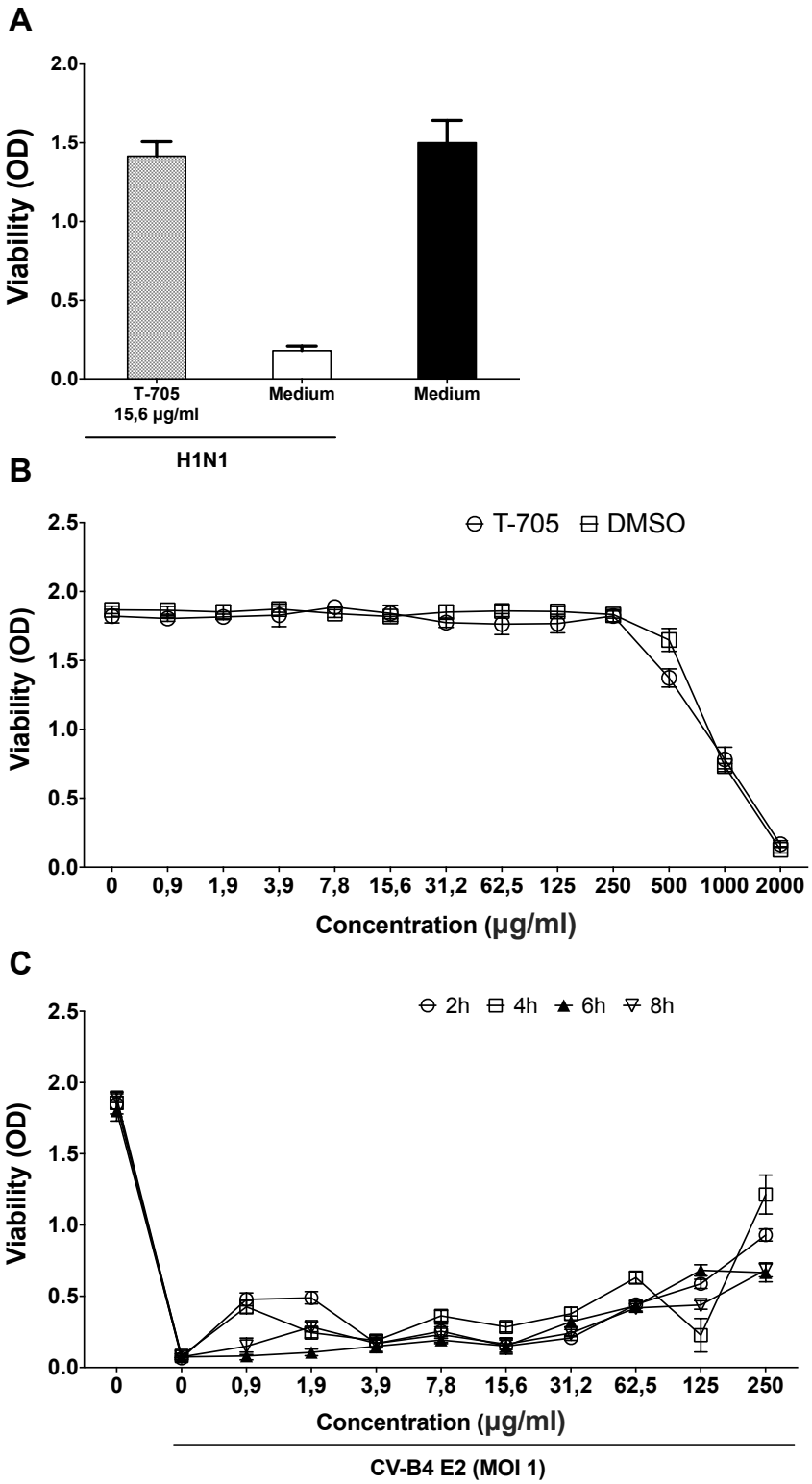

Figure 31: Etude de l'activité anti-CV-B4 E2 du favipiravir (T-705). Des cellules MDCK infectées par H1N1 ont été traitées avec T-705 (A). Des dilutions en série de 2 en 2 de T-705 sont ajoutées à des cultures de cellules HEp-2 et incubées afin de déterminer les concentrations toxiques (B). Les concentrations de T-705 non toxiques sont ajoutées 2h, 4h, 6h et 8h après l'inoculation de CV-B4 E2 (MOI 1) à des cultures de cellules HEp-2 (C). La viabilité des cellules est évaluée par la méthode d'Orangu, les résultats sont exprimés en Densité Optique (lecture à 450 nm). Les résultats sont les moyennes +/- écart-types de 2 expériences indépendantes.

La figure 5 montre que favipiravir à 15,6 µg/ml parvient à inhiber l'effet cytopathique de H1N1 vis-à-vis des cellules MDCK 5 (Fig 31 A). Le favipiravir est toxique aux concentrations 500, 1000 et 2000 µg/ml vis–à-vis de cellules HEp-2 (Fig 31 B).

Quand le favipiravir est ajouté aux cultures de cellules HEp-2 à 250 µg/ml, à 4h post infection, la viabilité des cellules est augmentée (DO : 1,21 +/- 0,13 contre 0,08 +/- 0,01 pour les cellules non traitées, p = 0,05 et les valeurs de DO sont proches de cellules obtenues avec les cellules contrôles (DO : 1,85 +/- 0,04, p = 0,07).

- **Fluoxétine**

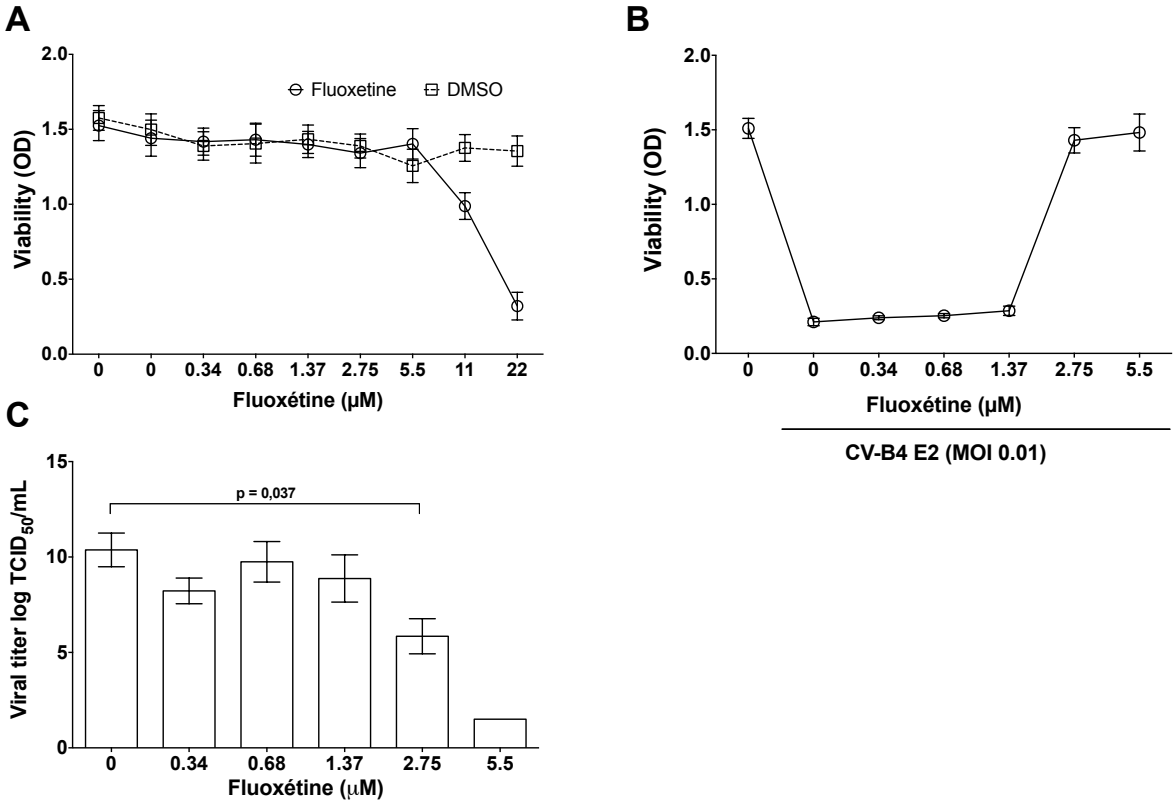

Figure 32: La fluoxétine inhibe l'infection à CV-B4 E2 de cellules beta pancréatiques murines *in vitro*. Des cellules Min-6 (10^5) sont déposées dans des micropuits. Des dilutions en série de 2 en 2 de fluoxétine sont ajoutées aux cellules HEp-2 et incubées afin de déterminer les concentrations toxiques (A). CV-B4 E2 (MOI 0.01) est incubé avec les cellules pendant 2h. Après lavage des tapis de cellules, la fluoxétine est ajoutée à des concentrations non toxiques. La viabilité des cellules infectées et traitées par la fluoxétine a été évaluée par le test Orangu quand le contrôle était à 100% d'ECP (B). Les titres de virus dans les surnageants sont déterminés sur cellules HEp-2 par la méthode de Spearman & Karber et exprimés en log DICT50/ml (C). Les résultats sont la moyenne +/- écart-types de 3 expériences indépendantes.

La viabilité mesurée par le test Orangu, montre que la fluoxétine est toxique pour les cellules beta pancréatiques murines (lignée Min-6) aux concentrations 11 et 22 µM (Fig. 32 A). En présence de fluoxétine, aux concentrations 2,75 et 5,5 µM les cellules beta pancréatiques murines sont protégées de l'effet cytopathique du virus. En effet la viabilité de ces cellules (DO 1,43 +/- 0,08 et 1,48 +/- 0,12 respectivement avec ces concentrations de fluoxétine) est accrue par rapport aux cellules non traitées (DO de 0,21 +/- 0,02) (Fig. 32 B). Les concentrations de Fluoxétine inférieures à 2,75 µM ne protègent pas les cellules de l'ECP induit par CV-B4 E2.

La fluoxétine à 5,5 µM a inhibé la réplication du CV-B4 E2 puisqu'on ne détecte pas de particules infectieuses au-dessus de la limite de détection du test qui est de 1,5 log DICT50/ml. La concentration 2,75 µM de Fluoxétine qui a protégé les cellules de l'ECP induit par CV-B4 E2 a inhibé de moitié la réplication du virus, en effet le titre viral des surnageants de cultures de cellules traitées est 5,85 +/- 0,91 log DICT50/ml contre 10,37 +/- 0,88 log DICT50/ml pour les cellules non traitées (p=0,037) (Fig. 32 C).

L'effet de la fluoxétine vis-vis de CV-B4 E2 dans des cultures organotypiques de pancréas de souris a été étudié.

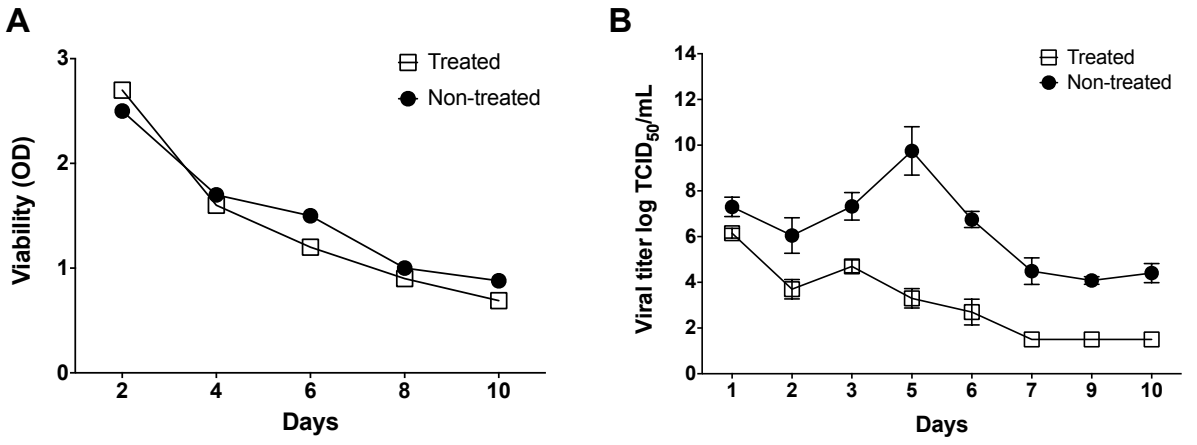

Figure 33: La fluoxétine inhibe la réplication de CV-B4 E2 dans des cultures de fragments de pancréas de souris *in vitro*. Des souris âgées de 3 semaines ont été sacrifiées et leurs pancréas prélevés, découpés et mis en culture dans du milieu DMEM. La viabilité des fragments de pancréas est évaluée par le test Orangu (A). Les cultures de fragments de pancréas de souris sont inoculées avec CV-B4 E2 (7.10^6 $DICT_{50}$) puis traitées tous les jours avec la fluoxétine à 5,5 µM. Les particules infectieuses produites sont titrées tout au long du suivi de la culture (B). Les résultats sont exprimés en log de DICT50/ml. Les résultats sont la moyenne +/- écart-types de 2 expériences indépendantes.

Les pancréas de souris ICR-CD1 âgées de 3 semaines sont prélevés, découpés puis mis en culture dans du DMEM. Les fragments de pancréas sont inoculés avec CV-B4 E2 (7.10^6 $DICT_{50}$) puis traités tous les jours avec la fluoxétine à 5,5 µM. La viabilité des cultures contrôles et infectées décroit progressivement de J2 à J10 (Fig. 33). Les titres infectieux des surnageants de culture sont déterminés.

A J5 les titres des surnageant de culture de fragments de pancréas non traités et traités avec la fluoxétine à 5,5 µM sont 9,75 +/- 1,06 log $DICT_{50}$/ml et 3,3 +/- 0,42 log $DICT_{50}$/ml respectivement ($p < 0,05$) (Fig. 33 B). A J7, J9 et J10, le titre infectieux des surnageants de culture de fragments de pancréas traités est à la limite de détection du test (1,5 log $DICT_{50}$/ml), alors que les titres infectieux des surnageants de fragments de pancréas non traitées sont 4,46 +/- 0,58, 4,08 +/-0,16 et 4,40 +/- 0,41 log $DICT_{50}$/ml respectivement ($p < 0,05$) (Fig. 33 B)

L'inhibition de la réplication de CV-B4 E2 dans des cultures organotypiques de pancréas murins obtenue avec la fluoxétine nous a incité à étudier l'effet de la molécule *in vivo* chez des souris inoculées avec le virus.

Des souris ICR-CD1 de 3 semaines inoculées par voie intrapéritonéale avec CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$) sont traitées par voie orale avec la fluoxétine (10mg/kg) à J-1, J0, J1, J3 et J5 post-infection. Les animaux ont été sacrifiés à J21 et le pancréas, la rate, les intestins et le cœur ont été récupérés afin d'étudier la présence de particules infectieuses et d'ARN enteroviral dans ces organes.

Nous n'avons pas détecté de particules infectieuses par la méthode des plages de lyse (Plaque Forming Units) dans les organes obtenus au jour 21 post-infection chez des souris inoculées avec CV-B4 E2 traitées ou non avec la Fluoxétine.

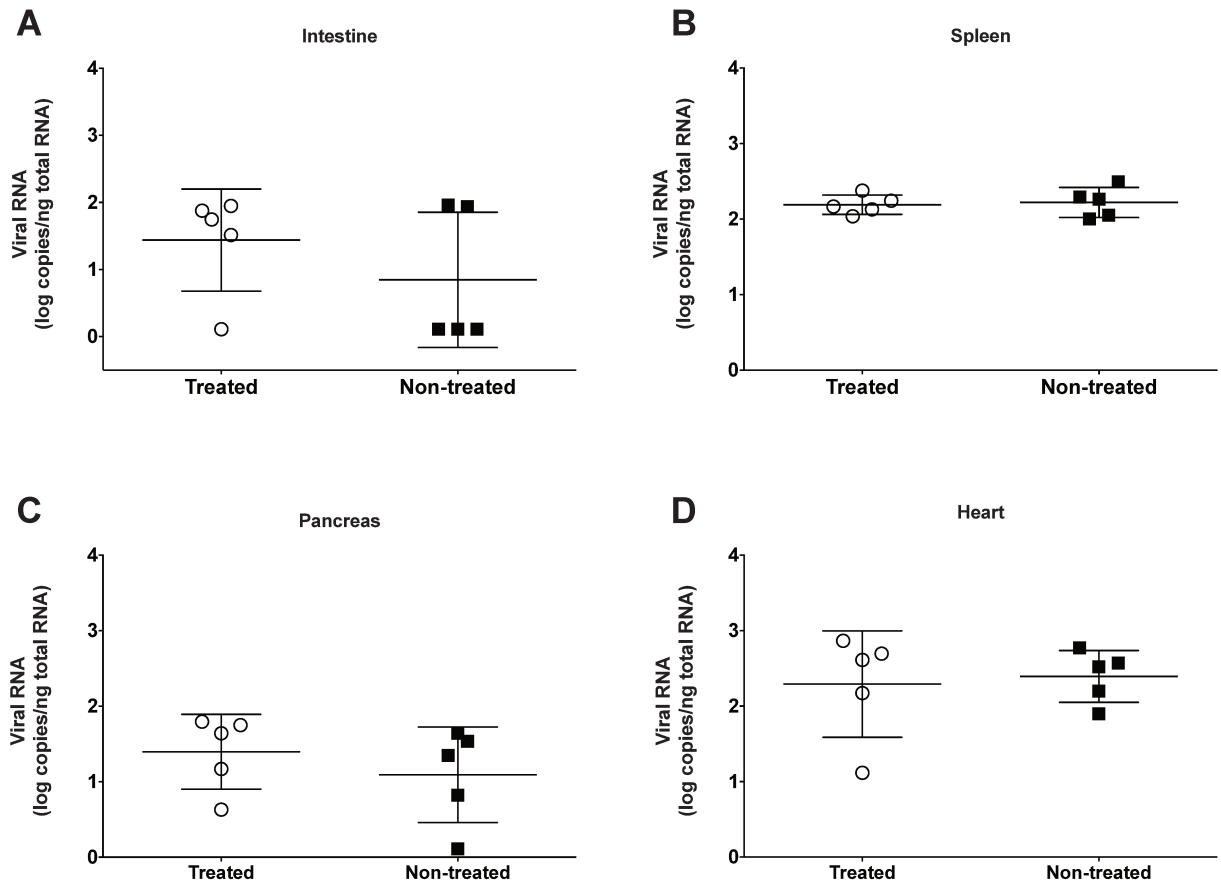

Figure 34: ARN entéroviral dans les organes de souris inoculées avec CV-B4 E2 puis traitées ou non par la fluoxétine. Des souris ICR-CD1 inoculées avec CV-B4 E2 puis traitées ou non par la fluoxétine ont été sacrifiées à 21 j post-infection pour récupérer, l'intestin grêle, la rate, le pancréas et le cœur. La présence d'ARN viral dans les organes a été recherchée par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en log de copies par ng d'ARN total.

La figure 8 montre qu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes de souris. En effet, dans l'intestin de souris traitées la quantité d'ARN viral est de 1,43 +/- 0,76 log copies/ng d'ARN total contre 0,84 +/- 1 log copies chez les souris non traitées. Dans la rate les quantités d'ARN viral sont peu différentes, 2,19 +/- 0,12 et 2,22 +/- 0,19 log copies/ng d'ARN total chez les souris traitées et non traitées respectivement.

IV. Infection naturelle à entérovirus chez des porcelets

Les entérovirus porcin sont membre de la famille des Picornaviridae. Ce sont des agents pathogènes très répandus et responsables d'infection asymptomatiques. Cependant, certaines infections sont associées à des syndromes pathologiques tel que la polio-encéphalomyélite. Les porcelets nouveau-nés sont sans défense, en effet les porcs sont caractérisés par un placenta épithéliochorial où le sang maternel et foetal sont séparés par une épaisse barrière empêchant ainsi les anticorps de passer au fœtus. Les porcelets sont donc nés immunologiquement vierge et par conséquent exposés à une variété de pathogènes.

Les porcs rencontrent naturellement les entérovirus porcins dès la naissance. Afin de déterminer si les porcelets ont été en contact avec un entérovirus, nous avons étudié la présence d'anticorps IgG anti-VP4 des entérovirus G dans le sérum par dosage immuno-enzymatique. Dans la mesure où les IgG de la mère ne passent pas la barrière placentaire, la présence d'IgG anti-VP4 chez le porcelet est un marqueur de contact avec les entérovirus.

1. L'exposition naturelle de porcelets aux entérovirus étudiée grâce à la détection d'anticorps anti-VP4 d'EV-G1

Les prélèvements sanguins chez des porcelets ont été effectués à l'âge de 9 semaines (J1) et 39 jours plus tard (J39). Les sérums ont été obtenus à partir de ces échantillons de sang et le niveau d'anticorps anti-VP4 a été évalué par ELISA. Une élévation modérée de la D.O. a été observée dans les échantillons des sérum appariés du porcelet N°2 (0.53 vs. 0.70 à J1 et J39 respectivement, par contre des niveaux de D.O. plus élevés ont été observés dans les sérums appariés du porcelet N°5 (0,33 vs 1,11 à J1 et J39 respectivement).

Plus globalement, pour chaque porcelet la valeur de D.O. était plus élevée avec le sérum obtenu à J39 par rapport au sérum obtenu à J1 (Fig. 35.A). La différence de D.O. obtenue entre J1 et J39 dans les échantillons appariés des 10 porcelets était statistiquement significatives (P = 0.002). L'augmentation de D.O. détectée dans le sérum entre J39 et J1 par une technique ELISA avec un peptide VP4 d'EV-G1 fixé aux micro-puits nous a incités à évaluer l'activité neutralisante anti- EV-G1 de ces échantillons de sérum.

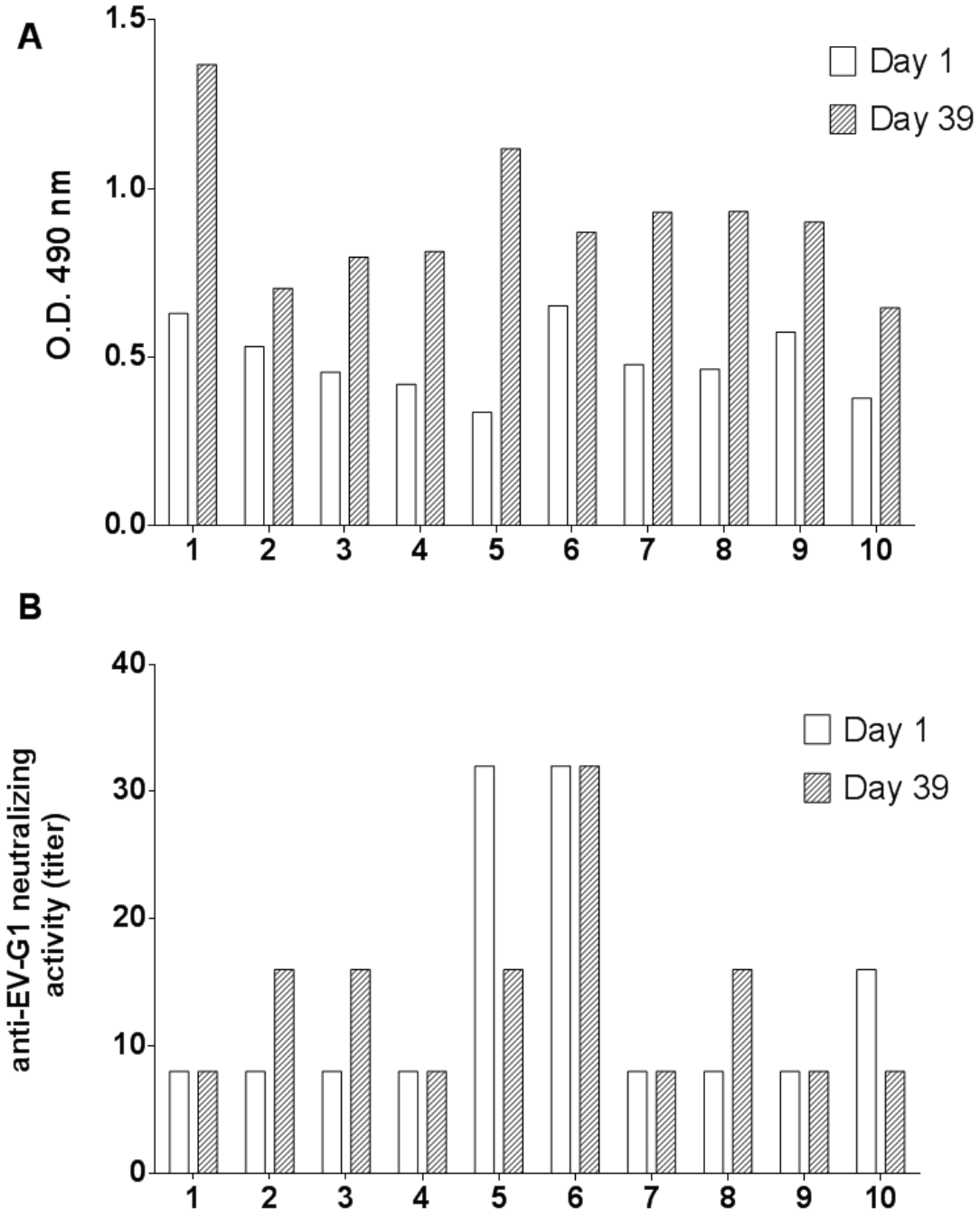

Figure 35 : Représentation individuelle des IgG anti- VP4 d'EV-G1 détectés par ELISA (A) et de l'activité neutralisante anti-EV-G1 par séroneutralisation (B) des échantillons de sérum provenant de 10 porcs collectés à l'âge de 9 semaines (Day 1) et 39 jours plus tard (Day 39).

Dans 7 des 10 échantillons de sérums obtenus à J1, les titres de l'activité neutralisante anti-EV-G1 était de 8 alors que dans les autres échantillons les titres étaient de 32 ou 16 (porcelets 5,6 et 10). Dans les échantillons de sérums appariés obtenus à J39, les valeurs des titres était presque inchangés (une seule dilution) (Fig. 35 B). La différence des valeurs des titres

obtenus à J1 et J39 dans les échantillons appariés des 10 porcelets dans notre étude n'était pas statistiquement significative (P > 0.9).

Il n'y avait pas de relation entre les valeurs obtenues à l'aide du test ELISA basé sur un peptide de VP4 d'EV-G1 et par séroneutralisation dans nos expériences.

Dans la mesure où VP4 est la protéine la plus conservée parmi les quatre protéines de capside des entérovirus, il ne peut être exclu que le test ELISA basé sur un peptide de VP4 d' EV-G1 VP4 détecte des anticorps dirigés contre la protéine VP4 d'autres entérovirus porcins. Pour explorer cette hypothèse, les séquences protéique d'EV-G1-4 et EV-G6 disponibles dans la base de données GenBank ont été récupérées et les séquences de la VP4 ont été comparées en utilisant le logiciel Clustel Omega.

A

```
VP4 peptide      MGMQMSKNVAGSHTTVTKASGGSNIYYTNVNYYNHSASASQNKQDVTQDP
EV-G1            ........T.........Q.....H.N...I...S...........I....
EV-G2            ..A.V...T.......G.Y.T.....H...I...S...........LA...
EV-G3            ..................Q.T.....H...................IQ...
EV-G4            ..................Q.....T.K...I...S...........I....
EV-G6            ..................Q.TN..K.H...I...............I....
Enterovirus G    ........T.........Q.....H.N...I...S...........I....
                 ** *:***.****** * *:.** * ***:***.***********: ***
```

B

```
VP4 peptide      MGMQMSKNVAGSHTTVTKASGGSNIYYTNVNYYNHSASASQNKQ------------DVTQDP
Sapelovirus      LGQVHSSNT-GNKPQGAYNHG--SGSITQVNYYGSDYSQAWNPT------------QQQMDP
Teschovirus      ----SSRMENG----NTNNSG--NTGVINYNFYSNSYTDAVDLSGAMSSQESNAAENAASGP
                      *    *     :   *  .    : *:*  . : : :             :    *
```

Figure 36: Analyse bio-informatique de la variabilité des acides aminés de la protéines VP4 de EV-G1-4 et EV-G6 (A), de *Teschovirus* et de *Sapelovirus* (B) par rapport à la séquence du peptide de VP4 de EV-G1, englobant 50 acides aminés, utilisés comme antigène dans le test ELISA.

*** Acide aminé entièrement conservé**

: Acide aminé avec des propriétés fortement similaires.

. Acide aminé avec des propriétés peu similaires.

L'alignement de séquence a révélé que 44 acides aminés de la séquence VP4 de différents EV-G et de celle de VP4 de EV-G1 étaient similaires (88% homologie) dont 37 identiques (74% identité) (Fig. 36 A). Par contre le niveau d'homologie entre la séquence VP4 de EV-G1 et celle des virus porcins appartenant au genre Teschovirus et Sapelovirus était beaucoup plus

bas, il y avait uniquement 15 acides aminés similaires (30% homologie) dont seulement 6 identiques (12% identité) (Fig. 36 B).

DISCUSSION

I. Monocytes et macrophages cibles de CV-B4 E2 *in vitro* et *in vivo*

La présente étude se focalise sur la problématique de l'infection des monocytes-macrophages par CV-B4 E2. Plusieurs aspects de cette étude méritent d'être soulignés. Nous avons utilisé CV-B4 E2 isolé d'un patient atteint de diabète de type 1 (DT1). CV-B4 E2 n'est pas un pathogène naturel de souris, cependant, il est capable d'infecter les souris Swiss Albinos (= ICR-CD1) et de persister chez ces animaux (Jaidane et al., 2006 ; Jaidane et al., 2009 ; El Hiar et al., 2012). Par ailleurs, CV-B4 E2 est capable d'infecter des cellules murines *in vitro* et notamment les cellules de la rate et du thymus (Jaidane et al., 2008 ; 2012), et il a été récemment montré que l'infection des splénocytes murins par CV-B4 E2 pouvait être facilitée par des IgG de souris préalablement infectées par ce virus (Elmastour et al., 2016).

L'identification de cellules cibles du virus dans notre système repose sur une combinaison de travaux *in vitro* et *in vivo* et sur la sélection des cellules grâce à un enrichissement cellulaire effectué à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps et de tri par cytofluorométrie. Cette approche a permis l'identification des monocytes-macrophages comme cibles de CV-B4 E2 dans un modèle murin. Dans des travaux antérieurs relatifs à l'infection de tissus ou de cellules de souris *in vivo* ou *in vitro* respectivement, la présence de l'ARN entéroviral a été étudiée par RT-PCR (Elmastour et al., 2016). Dans la présente étude, le niveau intracellulaire d'ARN entéroviral a été mesuré par RT-PCR quantitative, ce qui a permis la comparaison des quantités d'ARN viral dans les différentes populations cellulaires *in vitro* et *in vivo*. En plus, la quantification de l'ARN enteroviral combinée avec la sélection positive des cellules a permis l'identification des cellules cibles pour lesquelles l'infection est facilitée quand le virus est au préalable incubé en présence de sérum immun *in vitro*.

Cette étude montre que CV-B4E2 est capable d'infecter les cellules de la moelle osseuse ainsi que les splénocytes *in vivo*. La quantité d'ARN viral dans ces tissus est supérieure à celle retrouvée dans le sang ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'un artefact dû à la présence de sang dans les organes renforçant ainsi l'hypothèse de la présence du virus dans ces organes.

Les cellules obtenues à partir de la moelle osseuse et de la rate 7 jours après l'inoculation du virus ne survivent pas en culture, mais par contre dans du milieu contenant du M-CSF, les cellules de la moelle ont été maintenues en culture. C'est ainsi que des particules infectieuses ont été isolées à partir des cellules de la moelle osseuse mais pas à partir des splénocytes. L'ARN viral a été détecté dans les cellules de la moelle osseuse récupérée au $10^{ème}$ jour de culture et dans les splénocytes après un jour de culture. La détection négative de particules infectieuses dans le surnageant de culture des splénocytes murins n'était pas due à une inhibition de la réplication virale dans les cellules humaines (lignée HEp-2) utilisées pour le titrage, car ces cellules ne sont pas sensibles aux facteurs antiviraux murins (Jaidane et al., 2008).

L'infection des cellules de la moelle osseuse de souris ICR-CD1 inoculées avec CV-B4 E2 observée dans notre étude est en accord avec les données récentes de l'infection des cellules de la moelle osseuse isolées de souris C57/BL6 inoculées par le virus CV-B3 (Althof & Whitton, 2013). Dans nos expériences quand les cellules murines de la moelle osseuse ont été inoculées avec CV-B4 E2 *in vitro* et puis maintenues en culture dans du milieu contenant du M-CSF, des particules infectieuses ont été retrouvées dans le surnageant, et en plus, l'ARN enteroviral intracellulaire a été retrouvé jusqu'à 10 jours p.i. Quand les cellules murines de la moelle osseuse ont été maintenues dans du milieu de culture contenant du M-CSF pendant 10 jours, puis inoculées avec le virus CV-B4, des taux élevés de particules virales ont été retrouvés dans le surnageant de culture jusqu'à 5.25 +/- 1.06 log TCID50/ml 2 jours p.i., et de l'ARN enteroviral a été retrouvé dans les cellules collectées 5 jours p.i. Il est important de noter que les cellules cultivées dans du milieu M-CSF correspondent essentiellement à des macrophages (98% CD11b+ / F4/80+). Plus globalement, nos observations sur des souris *in vivo* et sur des cellules murine *in vitro* montrent que les cellules résidentes de la moelle osseuse sont infectables par le virus CV-B4 *in vivo*, et que les macrophages dérivés de la moelle osseuse sont des cellules cible du virus. La proportion de monocytes et macrophages dans la moelle osseuse des souris est faible (<0.5%) (Yang et al., 2013). Il reste à déterminer si *in vivo* chez les souris inoculées avec CV-B4 E2, le virus présent dans les macrophages résidents et se transmet aux cellules maintenues en culture dans du milieu contenant du M-CSF, ou dans les cellules de la lignée myéloïde, qui sont prédominantes dans la moelle osseuse.

L'ARN enteroviral a été retrouvé dans les splénocytes isolés de souris inoculées avec CV-B4 E2. La sous-population CD14+ ainsi que la sous-population CD14- mais à des niveaux plus bas hébergeaient de l'ARN entéroviral dans ce modèle d'infection. La méthode utilisée dans notre expérience pour isoler les cellules a permis de récupérer jusqu'à 90% ou plus de cellules CD14+, cependant, les cellules CD14+ (moins de 10%) peuvent être présentes dans la fraction cellulaire CD14- et vice versa. De ce fait, la présence de contaminants cellulaires dans ces populations ne peut être exclue. Cependant, dans la mesure où les cellules CD14+, et non les CD14-, ont été infectées *in vitro* par le virus, cette observation suggère que seules les cellules CD14+ sont la cible du virus. Néanmoins, puisque les cellules spléniques de souris infectées ont été obtenues 7 jours après l'inoculation de CV-B4 E2, il ne peut être exclu que le virus se soit propagé *in vivo* à différentes populations cellulaires en plus des cellules CD14+, qui sont la cible de CV-B4 E2 dans les cultures à court terme. Il reste à déterminer si les cellules CD14- en plus des cellules CD14+ sont la cible de CV-B4 E2 *in vivo*.

L'ARN entéroviral a été retrouvé dans les cellules F4/80+ et F4/80- de la rate de souris inoculées avec CV-B4 E2. De plus, de l'ARN enteroviral a été retrouvé dans ces sous-populations cellulaires quand elles ont été inoculées *in vitro* avec CV-B4 E2. La quantité d'ARN viral est plus élevée dans les cellules F4/80- par rapport aux cellules F4/80+ *in vivo* et *in vitro*. Comme mentionné précédemment la présence de contaminants cellulaires ne peut pas être exclue lors de la séparation cellulaire. Cependant, si on prend en considération le fait que l'ARN viral a été détecté uniquement dans les cellules CD14+ quand le virus a été inoculé aux cultures de cellules *in vitro*, nous devons admettre que parmi les cellules CD14+ le virus infecte les cellules F4/80+, qui sont des macrophages et les cellules F4/80- qui sont des monocytes. En effet, l'infection des monocytes et macrophages par CV-B4 E2 observée dans nos expériences est en accord avec la présence de ces cellules dans la rate (Yang et al., 2013). L'observation de niveaux plus élevés d'ARN viral dans les cellules F4/80- suggère qu'elles sont plus infectables que les cellules F4/80+.

Récemment, l'infection des macrophages dérivés des monocytes (MDM) humains par CV-B4 E2 a été rapportée par notre équipe (Alidjinou et al., 2015). Il a été observé que le virus persiste dans ces cellules et induit une réaction inflammatoire. L'interaction entre CV-B4 E2 et les macrophages peut jouer un rôle dans la pathogenèse des maladies induites par le virus. Le rôle des monocytes /macrophages dans l'évolution de l'infection par CV-B4 E2, *in vivo*, demeure inconnu. En vue d'élucider cette problématique, un modèle animal est

nécessaire. La présente étude montre que CV-B4 E2 est capable d'infecter les Monocytes/ Macrophages des souris ICR-CD1 *in vitro* et *in vivo*, ce qui ouvre des perspectives pour des investigations approfondies concernant le rôle de ces cellules au cours de l'infection.

Il a été récemment rapporté par notre équipe que du sérum immun de souris infecté par CV-B4 E2, dilué à 1:500 ou à 1:1000, facilitait l'infection à CV-B4 E2 des splénocytes *in vitro* (ElMastour et al., 2016). Dans la présente étude nous avons observé que le sérum immun dilué à $1/10^3$, $1/10^4$ or $1/10^5$ facilitait l'infection des cellules CD14+ de la rate, mais pas les cellules CD14-. L'infection des cellules F4/80+ ainsi que celle des cellules F4/80- était facilitée également grâce au sérum immun dilué. Nos résultats suggèrent que le sérum immun facilite l'infection des monocytes (CD14+ F4/80-) et des macrophages (CD14+ F4/80+) par CV-B4 E2. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le système humain, dans lequel l'infection des monocytes CD14+ du sang périphérique et celle de cellules de type monocyte/macrophage (lignée THP-1 activée par du phorbol ester) par CV-B4 est facilitée par du sérum immun (Hober et al., 2001). Par contre quand CV-B4 E2 est incubé avec du sérum immun, l'infection de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris n'est pas facilitée. Cette observation rappelle celle de l'absence de facilitation par du sérum immun de l'infection à CV-B4 de macrophages dérivés de monocytes humains (Alidjinou et al 2015).

En conclusion, l'ARN entéroviral a été retrouvé dans la rate et dans la moelle osseuse des souris infectées par CV-B4 E2. Au niveau de la rate, la présence du virus a été détectée spécifiquement dans les cellules CD14+ et F4/80+ *in vitro* et *in vivo*. La moelle osseuse renfermait de l'ARN entéroviral, et quand les cellules de la moelle osseuse ont été différenciées en macrophages (BMDM) *in vitro* avec du M-CSF, ces cellules ont été infectées avec CV-B4 E2 comme cela a été prouvé par la présence de particules infectieuses dans le surnageant de culture et d'ARN entéroviral intracellulaire. Le sérum de souris infectées par CV-B4 E2 a facilité l'infection des cellules CD14+, F4/80+ et F4/80- *in vitro* mais pas celle des BMDM. Au total dans le système murin les macrophages sont des cellules cibles de CV-B4 et des anticorps sériques sont en mesure de faciliter *in vitro* l'infection par ce virus des monocytes et des macrophages, notamment ceux issus de la rate.

II. Modèle murin de diabète induit par CV-B4 E2

Une hyperglycémie supérieure à 300 mg/dl est induite chez des souris non-consanguines (ICR-CD1) ayant reçu par voie intrapéritonéale un dose unique non diabétogène de STZ (35mg/kg) puis inoculées 12 jours plus tard par la même voie avec CV-B4 E2 (2.10^4 $DICT_{50}$). Quand des souris reçoivent soit cette même dose de STZ soit l'inoculum viral, la glycémie reste inférieure à 300 mg/dl. Les valeurs de glycémie observées chez des souris ICR CD1 non à jeun dans nos expériences (100 à 150 mg/dl) sont proches de celles mesurées chez des souris SJL également non à jeun (80 à 120 mg/dl) par d'autres chercheurs (Horwitz et al., 2003).

Toniolo et al (1980) avaient montré qu'en combinant STZ et inoculation d'un entérovirus (CV-B3 et CV-B5) ou d'un cardiovirus (EMC) des souris développaient une hyperglycémie, mais notre étude se distingue des travaux précédents, et plusieurs considérations sont notables. Nous rapportons l'effet diabétogène de CV-B4 E2 chez des souris ICR-CD1 préalablement traitées avec la STZ alors que dans l'étude précédente les souris, exposées à d'autres virus, étaient consanguines (SJL/J et NFS/N inoculées avec CV-B3 ou CV-B5). De plus la présente étude met en évidence une relation entre hyperglycémie et hypoinsulinémie chez les animaux traités par STZ et CV-B4 E2 ainsi que la présence de virus et de marqueurs d'inflammation dans le pancréas.

L'infection des souris dans notre étude est documentée par la présence de virus infectieux et par la quantification d'ARN viral dans les broyats de pancréas. L'infection ne peut-être affirmée que lorsque le virus est retrouvé dans les tissus. Le virus infectieux est retrouvé dans le pancréas 5 jours après inoculation de CV-B4 E2 mais pas au-delà. Néanmoins l'ARN viral est détecté jusque J15 post-inoculation mais pas à J20 ni J25. Chez les souris sacrifiées à J20 et J25 dans notre étude la détection d'ARN étant négative, il n'est pas exclu que le virus ait été éliminé. Chez ces souris préalablement traitées par STZ, l'observation de taux sanguins de glucose et d'insuline normaux suggère que le virus n'ait pas eu d'impact sur l'homéostasie glycémique à cause d'un inoculum trop faible. A l'opposé, il est observé que chez une souris infectée, avec présence d'ARN viral dans le pancréas (à J 21), la glycémie et l'insulinémie sont normales, ce qui suggère que l'effet diabétogène du virus chez les animaux exposés à la STZ dépend de facteurs de l'hôte qui restent à découvrir.

Le rôle de l'inflammation dans le développement du diabète de type 1 est fortement suspecté (Cabrera et al., 2016). Dans notre modèle de diabète de type 1 induit par CV-B4 E2 chez des souris préalablement traitées par la STZ, l'inflammation du pancréas a été étudiée. Etant donné que 5 jours après l'inoculation du virus, chez les animaux traités préalablement par la STZ, le déséquilibre glycémique a été constaté et la présence du virus dans le pancréas est détectée, l'étude du profil inflammatoire des pancréas a été réalisée à partir des tissus prélevés à cette date. Les concentrations tissulaires pancréatiques de cytokines inflammatoires (IP-10, TNFα et IFNγ) ont été déterminées. L'organe a été broyé en ajoutant des antiprotéases et les concentrations de cytokines ont été obtenues à l'aide de tests immunoenzymatiques. Cette approche a été déjà appliquée à d'autres tissus pour établir le profil inflammatoires d'animaux exposés à du LPS (McDuffie et al., 2006). Dans la présente étude les résultats ont été standardisés par rapport à la quantité d'ARN total contenue dans le fragment d'organes alors que d'autres chercheurs avaient rapporté les valeurs obtenues à la quantité totale de protéine (McDuffie et al., 2006). Nous avons ainsi observé que les concentrations pancréatiques de TNFα et d'IFNγ ne sont pas significativement différentes chez les souris contrôles et chez les animaux exposés soit à la STZ soit à CV-B42 soit à la combinaison des deux. Par contre les concentrations pancréatiques d'IP-10 chez les souris exposées à la STZ et au CV-B4 E2 et hyperglycémiques étaient significativement plus élevées que chez les souris contrôles, néanmoins les valeurs n'étaient pas supérieures à celles obtenues chez les animaux ayant reçu soit la STZ soit CV-B4 E2 et qui n'étaient pas hyperglycémiques. Ainsi, l'augmentation de la concentration d'IP-10 pancréatique n'est pas corrélée à l'hyperglycémie obtenue en traitant les souris avec STZ et CV-B4 E2. Nous avons cependant observé que les valeurs d'IP-10 étaient plus élevées chez ces animaux présentant une hyperglycémie que chez l'individu exposé au même traitement mais normoglycémique. Tous les animaux de ce groupe hyperglycémiques ou non étaient infectés comme le prouve la détection de virus infectieux et d'ARN viral dans un fragment de tissu pancréatique.

Dans la mesure où les concentrations d'IP-10 mais non celles du TNFα et d'IFNγ sont élevées chez les souris exposées à la STZ et au CV-B4 E2, il peut être suggéré que la réaction inflammatoire concerne les cellules pancréatiques productrices d'IP-10 plutôt que les cellules de l'immunité productrices de TNFα et d'IFNγ. Cette réaction inflammatoire est observée *in vivo* également en réponse à la STZ d'une part et au CV-B4 E2 d'autre part, or dans ces conditions les animaux ne sont pas hyperglycémiques. Ainsi la production excessive d'IP-10 n'est pas corrélée à l'hyperglycémie induite chez les souris par l'effet combiné de la STZ et

de CV-B4 E2. Il reste à déterminer si d'autres cytokines que l'IP-10 et/ou d'autres facteurs induits par CV-B4 E2 chez des souris préalablement traitées par STZ sont impliqués dans l'hypoinsulinémie associée à une hyperglycémie.

Dans le pancréas de chacune des souris traitées par CV-B4 E2 combiné à la STZ et hyperglycémique, des lésions et un infiltrat inflammatoire du tissu endocrine sont observés, tandis qu'aucune lésion n'est observée dans le pancréas de la souris exposée à ce traitement mais normoglycémique ni dans le pancréas des souris traitées par la STZ ou le CV-B4 E2. Ces résultats indiquent que CV-B4 E2 induit chez les souris traitées par la STZ, une altération du tissu pancréatique endocrine qui est associée à l'hypoinsulinémie et à l'hyperglycémie observée chez ces animaux.

Afin d'étudier l'impact de la STZ combinée à CV-B4 E2 vis-à-vis des cellules beta pancréatiques, un modèle a été mis en œuvre *in vitro*. Des tapis de cellules béta murines de la lignée Min-6 productrices d'insuline ont été incubées avec la STZ puis inoculés avec CV-B4 E2. Ces cellules sont permissive au CV-B4 E2 comme l'indique la progénie virale mesurée dans les surnageants de culture dans nos expériences, ce qui est en accord avec les observations d'infection de ces cellules par CV-B3 rapportées antérieurement (Barbara et al., 2010). Nos travaux montrent que l'exposition préalable *in vitro* d'une lignée de cellules beta pancréatiques à la STZ n'a pas d'incidence sur le titre infectieux des surnageants de culture de ces cellules lorsqu'elles inoculées avec CV-B42.

Nous rapportons pour la première fois à notre connaissance que des cellules beta murines produisent de l'IP-10 lorsqu'elles sont exposées *in vitro* à la STZ d'une part et au CV-B4 E2 d'autre part. De plus nous avons observé que les concentrations d'IP-10 dans les surnageants de culture de cellules préalablement incubées en présence de STZ (1mM) puis inoculées avec CV-B4 E2 (MOI 10^{-5}) sont accrues par rapport aux contrôles. La stimulation de la production d'IP-10 par des cellules beta exposées au CV-B4 E2 est en accord avec les observations d'un impact similaire de CV-B4 sur des îlots humains *in vitro* rapporté par une autre équipe (Berg et al., 2006), mais la nature les cellules des îlots productrices d'IP-10 n'avait pas été identifiée. Il reste à déterminer si les concentrations pancréatiques d'IP-10 accrues par rapport aux contrôles chez les souris exposées *in vivo* à la STZ et au CV-B4 E2 sont dues à une production de cette cytokine par les cellules beta.

Les concentrations d'insuline dans les surnageants de cultures de cellules Min-6 inoculées avec CV-B4 à MOI 10^{-2} et 10^{-3} sont comparables à celles obtenues avec les surnageants de cellules contrôles. Une diminution des concentrations d'insuline sous l'effet de la STZ est observée avec les doses les plus élevées de la molécule et de manière plus marquée au-delà de 72h de culture et en rapport avec la viabilité réduite des tapis de cellules dans ces conditions. Or dans les surnageants de cultures de cellules traitées par STZ puis CV-B4 E2 les concentrations d'insuline sont peu différentes de celles obtenues avec les surnageants de cellules contrôles. Au total l'administration combinée de STZ et CV-B4 E2 à des cultures de cellules β pancréatiques en lignée continue ne provoque pas de réduction de la concentration d'insuline dans les surnageants. Ce résultat suggère que l'hypoinsulinémie induite chez les souris lorsqu'elles sont traitées par STZ puis inoculées avec CV-B4 E2 ne soit pas une conséquence d'un effet direct de l'effet combiné de la STZ et du virus sur les cellules beta pancréatiques. L'hypoinsulinémie chez les animaux est néanmoins associée à des lésions tissulaires du pancréas qui résultent probablement d'effets directes et indirectes du virus, reposant notamment sur l'inflammation du tissu avec en l'occurrence une production d'IP-10 et l'intervention d'autres facteurs en particulier les interférons de type I et les cellules de l'immunité innée (cellules NK, macrophages). Les mécanismes de l'hypoinsulinémie induite chez les souris lorsqu'elles sont traitées par STZ puis inoculées avec CV-B4 E2 restent à élucider, et l'étude de ces mécanismes sera l'objectif de futurs travaux du laboratoire.

Le diabète induit par CV-B4 E2 chez la souris que nous avons observé dans nos expériences s'apparente au DT1 fulminant, survenant chez des humains et décrit notamment au Japon, caractérisé par l'apparition rapide d'un hyperglycémie résultant d'une défaillance/destruction accélérée des cellules des ilots pancréatiques (Tanaka S. et al., 2009 ; aida K. et al., 2011). Le modèle combinant STZ et CV-B4 E2 chez des souris ICR-CD1 ouvre des perspectives pour mieux comprendre les mécanismes de ce type de diabète. De plus dans le contexte de l'hypothèse du rôle des entérovirus dans le diabète de type 1 auto-immun, qui est plus commun, le modèle combinant STZ et CV-B4 E2 permet d'une part de mieux comprendre les interactions entre le virus et l'hôte susceptibles de participer à la pathogenèse entérovirale de la maladie, et d'autre part d'étudier le rôle de facteurs de l'environnement capables à l'instar de la STZ de prédisposer l'hôte aux effets diabétogènes des entérovirus. Les futurs travaux du laboratoire seront dirigés dans cette direction.

III. Lutte anti-entérovirale

L'objectif de cette étude était d'identifier des molécules actives vis-à-vis de CV-B4 E2. Nos résultats montrent que les dérivés 6230, 6502, 6373 et 6473 (Laconi et al., 2011) et 6b, 7b, 8c, 9d et 10c (Bernard et al., 2014) conçus en utilisant la structure basique à la fois du pirodavir et du pleconaril comme modèle, avec des modifications substantielles de la chaîne hydrocarbonée centrale et dans le groupe pyridazinyl-pipéridinyle, n'ont pas ou peu d'effet vis-à-vis de CV-B4 E2 *in vitro* dans des cellules HEp-2.

Bernard et al (2015) ont testé ces antiviraux vis-à-vis de PV1, EV71, CV-B3 et EV-1. Seuls les dérivés 6230 et 6502 étaient actifs vis-à-vis d'EV-71 sur cellules RD. Aucun dérivé n'a eu d'effet vis-à-vis de CV-B3 et PV1 cultivés sur cellules Vero et BGM respectivement. Par contre tous les dérivés ont inhibé l'ECP induit par l'echovirus dans les cellules BGM. Dans nos travaux, seul le dérivé 9d a inhibé l'ECP induit par l'EV-11 dans les cellules GMK.

Le favipiravir est un inhibiteur d'ARN polymérase virale actif vis-à-vis du virus influenza à des concentrations comprises entre 0,1 et 10 μg/ml (Futura et al., 2013). Cette molécule est toxique pour les cellules HEp-2 à partir de 500 μg/ml. Le favipiravir a inhibé 50% de l'ECP induit par CV-B4 E2 dans des cultures de cellules Hep-2 mais à une concentration de 250 μg/ml, Cette concentration est nettement supérieure à celles qui inhibent d'autres picornavirus, FMDV (14 μg/ml) ou des entérovirus tel que EV-D68 (10μg/ml) sur cellules HeLa, et PV (4,8 μg/ml) sur cellules Vero (Sun et al., 2015, Futura et al., 2013).

La fluoxétine est toxique pour les cellules murines Min-6 à partir de 11μM et inhibe totalement la réplication de CV-B4 E2 à la concentration de 5,5 μM. Par ailleurs, la fluoxétine a aussi inhibé la réplication de CV-B4 E2 dans des cultures organotypiques de fragments de pancréas de souris. En effet, quand des fragments de pancréas en culture sont inoculés avec CV-B4 E2 et traités tous les jours avec la fluoxétine à 5,5 μM, les surnageants de culture récupérés 7 jours après l'inoculation du virus ne contiennent plus de particules infectieuses avec une viabilité semblable à celles des cellules contrôles. Par contre dans nos expériences *in vivo* la fluoxétine n'a pas d'effet sur la quantité d'ARN viral dans les tissus. La fluoxétine administrée per os à des souris conserve son activité biologique (Machado et al., 2012). Il reste à déterminer si des doses de fluoxétine plus élevées sont nécessaires pour observer un effet anti-CV-B4 E2 *in vivo* chez la souris. Par ailleurs il ne peut être exclu que le mode

d'inoculation du virus puisse jouer un rôle dans l'efficacité de la fluoxétine. Des travaux complémentaires reposant sur l'infection des animaux par voie orale sont requis pour explorer cette hypothèse (Jaidane et al., 2006).

Des études précédentes ont mis en évidence l'activité antivirale de la fluoxétine vis-à-vis de virus appartenant à l'espèce EV-D à l'espèce EV-B , notamment CVB1-3 ainsi que CV-B4 E2 dans des cellules humaines épithéliales (lignée HEp-2) et canalaires pancréatiques (lignée panc-1) (Ulferts et al., 2013 ; Zuo et al., 2012 ; Alidjinou et al., 2015). Notre étude montre que la fluoxétine est active vis-à-vis de CV-B4 E2 dans un modèle murin d'infection aigue de cellules béta pancréatiques murines *in vitro* ainsi que dans des fragments de pancréas murins. Il reste à déterminer si cette molécule peut agir *in vivo* et dans quelles conditions.

IV. Infection naturelle à entérovirus chez des porcelets

La présente étude est différente à bien des égards de celles d'autres chercheurs. Nous rapportons pour la première fois, qu'un test ELISA basé sur un peptide de la protéine VP4 d' EV-G est capable de détecter une élévation du niveau d'anticorps IgG dans des échantillons de sérum obtenus de porcelets âgés de 9 semaines et 39 jours plus tard.

Plusieurs points dans la présente étude méritent d'être soulignés. Le test immunologique mis en oeuvre montre une différence entre le niveau d'anticorps anti-VP4 d'EV-G1 dans des échantillons de sérums appariés, tandis que les titres d'anticorps neutralisants anti-EV-G1 ne sont pas différents. De ce fait, nous pouvons considérer que les anticorps anti-VP4 ne possèdent pas d'activité neutralisante ou que les niveaux sont trop faibles pour être détectés par notre test biologique. De plus, ces résultats confortent le fait que les anticorps neutralisants anti-EV sont dirigés contre la protéine VP1 plutôt que la protéine VP4 (Li et al., 1994).

L'augmentation des niveaux d'anticorps anti-VP4 dans les échantillons de sérum dans notre étude suppose que les porcelets avaient été exposés aux EV-G après sevrage. La détection négative d'activité neutralisante anti-EV-G1 dans le sérum n'exclut pas une possible infection par ce sérotype accompagnée par un niveau bas d'anticorps neutralisants. Néanmoins il ne peut être exclu que les anticorps anti-VP4 détectés par ELISA sont dirigés

contre d'autres virus EV-G que EV-G1 puisque la séquence de la protéine VP4 est hautement conservée dans l'espèce EV-G. En effet, l'alignement de séquences de la protéine VP4 des virus EV-G met en évidence 88% d'homologie (74% d'identité) des acides aminés. La détection d'anticorps dirigés contre la protéine VP4 de virus appartenant à d'autres genres de la famille des *Picornaviridae* comme les *Sapelovirus* et les *Teschovirus* est peu probable étant donné que la protéine VP4 de ces virus, capable d'infecter les porcs, partagent uniquement 30% d'homologie (12% d'identité) avec la protéine VP4 utilisée dans cette étude.

L'exposition des porcelets à des entérovirus peut être reflétée par une augmentation du niveau d'anticorps dans les échantillons de sérum. La détection des anticorps par ELISA est rapide et ne nécessite qu'un faible volume de sang. Des études complémentaires sont requises pour déterminer si ce test ELISA basé sur un peptide de la protéine VP4 d'EV-G peut être utilisé à des fins diagnostiques et/ou pour réaliser des études épidémiologiques. De plus, l'infection des porcs par EV-G est un modèle pour élaborer des stratégies destinées à prévenir les infections naturelles à entérovirus. La détection d'anticorps anti-VP4 d'EV-G par ELISA pourrait être un moyen de suivre les infections à enterovirus dans de tels protocoles. Des études seront orientées dans cette direction dans notre laboratoire.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Nos résultats montrent que l'ARN de CV-B4 E2 est retrouvé dans la rate et la moelle osseuse de souris inoculées avec le virus. La moelle osseuse de souris infectées, mise en culture dans un milieu contenant du M-CSF produit des particules infectieuses. La séparation de sous-populations cellulaire a permis de mettre en évidence que les cellules CD14+ et F4/80+ de la rate sont infectées *in vivo* et *in vitro*. Nous avons observé que CV-B4 E2 incubé avec du sérum de souris infectée par le CV-B4 E2 augmente l'infection des cellules CD14+, F4/80- et F4/80+ *in vitro* prouvée par la présence d'ARN entéroviral intracellulaire, par la présence de particules infectieuses et la détection d'une activité antivirale dans les surnageants de culture de ces cellules. Les cellules de la moelle osseuse sont infectées *in vitro* par CV-B4 E2 et lorsque ces cellules sont cultivées pendant 10 jours dans un milieu contenant du M-CSF elles sont permissives au CV-B4 E2. L'infection à CV-B4 E2 des macrophages dérivés de la moelle osseuse obtenus ainsi au bout de 10 jours de culture en présence de M-CSF n'est pas augmentée par le sérum de souris infectée.

L'inoculation de CV-B4 E2 à des souris ayant préalablement reçu de la streptozotocine induit une hyperglycémie détectée dans nos expériences le 5^{ième} jour post-infection. Cette hyperglycémie est accompagnée d'une hypoinsulinémie et de la détection de particules infectieuses et d'ARN viral dans le pancréas de souris infectées. L'inoculation de STZ et CV-B4 E2 aux animaux induit une production d'IP-10 dans le pancréas. L'analyse histologique des pancréas de souris diabétiques montre un infiltrat inflammatoire dans les ilots et le tissu exocrine ainsi qu'une involution adipeuse. Un modèle *in vitro* de cellules β pancréatiques (lignée Min-6) montre que l'association STZ et CV-B4 E2 n'augmente pas l'infection des cellules et ne modifie pas les concentrations d'insuline dans les surnageants de culture mais elle induit une production d'IP-10.

Le rôle des entérovirus dans la pathogenèse du diabète de type 1 est fortement suspecté, des molécules actives vis-à-vis des entérovirus seraient susceptibles de participer à la lutte contre l'initiation ou l'aggravation du DT1 provoquée par ces virus. Nous avons mis en évidence que des dérivés du pléconaril et du pirodavir inhibent *in vitro* l'effet cytopathogène induit par des echovirus *in vitro* mais pas celui induit par CV-B4 E2. Le favipiravir à concentrations élevées est un faible inhibiteur de l'effet cytopathique induit par CV-B4 E2 *in vitro*. La fluoxétine a une activité anti-CV-B4 E2 dans un système murin. En effet, la réplication de CV-B4 E2 est

inhibée dans des cellules β pancréatiques et dans des cultures organotypiques de fragments de pancréas de souris. Par contre, *in vivo* l'administration de fluoxétine par voie orale à des souris inoculées avec CV-B4 E2 n'a pas permis de réduire le taux d'ARN viral dans les tissus de ces animaux.

Les souris ne sont pas des hôtes naturels de CV-B4 E2 ni d'autres entérovirus humains. Un modèle d'infection naturelle par des entérovirus est nécessaire pour mieux comprendre la pathogenèse des infections et pour développer des moyens de lutte contre ces virus et les pathologies qu'ils provoquent. Les porcelets sont naturellement exposés à des enterovirus (EV-G). Nous avons étudié les infections à entérovirus chez ces animaux grâce à la détection d'anticorps dans le sérum de porcelet avec une méthode ELISA reposant sur un peptide de la protéine VP4 d'EV-G1. La protéine VP4 est hautement conservée parmi les quatre protéines de capside entérovirales. Une élévation significative des valeurs de DO des échantillons de sérum à J39 par rapport à J1 est mise en évidence grâce au test ELISA (P = 0,002 n =10). Par contre les titres d'anticorps neutralisants anti-EV-G1 de ces échantillons de sérum appariés ne sont pas différents. L'alignement de séquences du peptide VP4 d'EV-G1 a montré 88% d'homologie avec les autres EV-G suggérant que des anticorps dirigés contre des EV-G autre que EV-G1 peuvent être détectés avec notre méthode ELISA. Notre test ELISA ouvre la perspective de mettre en évidence une infection entérovirale chez des porcelets ce qui ouvre la voie à de futures études dans ce modèle animal d'infection naturelle.

Nos travaux ont permis d'atteindre les objectifs fixés initialement. Il a ainsi été montré chez des souris ICR-CD1 que les monocytes monocytes/macrophages sont des cibles du virus *in vivo.* Chez ces souris non-consanguines l'administration de streptozotocine beta suivie de l'inoculation de CV-B4 E2 provoque un diabète de type 1 associé à des lésions du pancréas endocrine, une production d'IP-10 par le pancréas et la présence de virus infectieux et d'ARN viral dans cet organe. La fluoxétine est une molécule de synthèse qui inhibe *in vitro* la réplication de CV-B4 E2 dans des cellules béta pancréatiques murines et dans des fragments de pancréas de souris ICR-CD1. Une infection naturelle à entérovirus peut être mise en évidence chez des porcelets par une approche indirecte reposant sur la détection d'anticorps anti-VP4 d'EV-G.

Les résultats de nos travaux ouvrent des perspectives. Les modèles mis en œuvre permettront d'étudier le rôle de l'infection des monocytes/macrophages dans l'infection à CV-B4 E2 et des anticorps facilitants *in vivo*. Le modèle de diabète viro-induit mis en oeuvre permettra d'analyser les mécanismes directs et indirects par lesquelles CV-B4 E2 provoque un déséquilibre de l'homéostasie glycémique. Dans ce cadre l'hypothèse de l'infection des cellules beta du pancréas *in vivo* sera abordée. Ce modèle animal sera mis à profit pour tester des moyens de lutte contre le virus.

BIBLIOGRAPHIE

Aida K, Nishida Y, Tanaka S, Maruyama T, Shimada A, Awata T, Suzuki M, Shimura H, Takizawa S, Ichijo M, Akiyama D, Furuya F, Kawaguchi A, Kaneshige M, Itakura J, Fujii H, Endo T, Kobayashi T.: RIG-I- and MDA5-initiated innate immunity linked with adaptive immunity accelerates beta-cell death in fulminant type 1 diabetes. Diabetes 2011 Mar;60:884–889.

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 Apr;116:51–54.

Alidjinou EK, Sane F, Engelmann I, Geenen V, Hober D: Enterovirus Persistence as a Mechanism in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. Discov Med 2014 Nov 18:273–282.

Alidjinou EK, Sané F, Engelmann I, Hober D: Serum-dependent enhancement of coxsackievirus B4-induced production of IFNα, IL-6 and TNFα by peripheral blood mononuclear cells. J Mol Biol 2013 Dec 13;425:5020–5031.

Alidjinou EK, Sané F, Trauet J, Copin M-C, Hober D: Coxsackievirus B4 Can Infect Human Peripheral Blood-Derived Macrophages. Viruses 2015 Nov 24;7:6067–6079.

Althof N, Whitton JL: Coxsackievirus B3 Infects the Bone Marrow and Diminishes the Restorative Capacity of Erythroid and Lymphoid Progenitors. J Virol 2013 Mar;87:2823–2834.

Andries K, Dewindt B, De Brabander M, Stokbroekx R, Janssen PA: In vitro activity of R 61837, a new antirhinovirus compound. Arch Virol 1988 Jun;101:155–167.

Andries K, Dewindt B, Snoeks J, Willebrords R, van Eemeren K, Stokbroekx R, Janssen PA: In vitro activity of pirodavir (R 77975), a substituted phenoxy-pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. Antimicrob Agents Chemother 1992 Jan;36:100–107.

Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, Ferrari SM, Giuggioli D, Colaci M, Manfredi A, Frascerra S, Franzoni F, Galetta F, Ferrannini E: CXCL10 (alpha) and CCL2 (beta) chemokines in systemic sclerosis--a longitudinal study. Rheumatology (Oxford) 2008 Jan;47:45–49.

Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P: Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2014 Mar;13:272–280.

Aradottir E, Alonso EM, Shulman ST: Severe neonatal enteroviral hepatitis treated with pleconaril. Pediatr Infect Dis J 2001 Apr;20:457–459.

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F: Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol 2009 Apr;27:669–692.

Berg A-K, Korsgren O, Frisk G: Induction of the chemokine interferon-gamma-inducible protein-10 in human pancreatic islets during enterovirus infection. Diabetologia 2006 Nov;49:2697–2703.

Bernard A, Lacroix C, Cabiddu MG, Neyts J, Leyssen P, Pompei R: Exploration of the anti-enterovirus activity of a series of pleconaril/pirodavir-like compounds. Antivir Chem Chemother 2015 Apr 1;24:56–61.

Bernard AM, Cabiddu MG, De Montis S, Mura R, Pompei R: Synthesis of new compounds with promising antiviral properties against group A and B Human Rhinoviruses. Bioorg Med Chem 2014 Aug 1;22:4061–4066.

Bolzán AD, Bianchi MS: Genotoxicity of streptozotocin. Mutat Res 2002 Dec;512:121–134.

Brahmkshatriya PP, Mehta AA, Saboo BD, Goyal RK: Characteristics and Prevalence of Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA). International Scholarly Research Notices 2012 Apr 8;2012:e580202.

Bresson D, von Herrath M: Humanizing animal models: a key to autoimmune diabetes treatment. Sci Transl Med 2011 Feb 2;3:68ps4.

Cabrera SM, Henschel AM, Hessner MJ: Innate inflammation in type 1 diabetes. Transl Res 2016 Jan;167:214–227.

Caliguiri LA, McSharry JJ, Lawrence GW: Effect of arildone on modifications of poliovirus in vitro. Virology 1980 Aug;105:86–93.

Chan C. N. J, Cockram S. C. (2008). Epidemiology of diabetes mellitus in china.Dans/ The Epidemiology of Diabetes Mellitus, Second Edition Edited by Jean-Marie Ekoe´, Marian Rewers, Rhys Williams and Paul Zimmet. Sep15 : 179-206.

Chehadeh W, Weill J, Vantyghem MC, Alm G, Lefèbvre 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 Jun;181:1929–1939.

Chehadeh W, Lobert P-E, 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 Nov 15;79:13882–13891.

Christen U, Edelmann KH, McGavern DB, Wolfe T, Coon B, Teague MK, Miller SD, Oldstone MB, von Herrath MG: A viral epitope that mimics a self antigen can accelerate but not initiate autoimmune diabetes. J Clin Invest 2004 Nov;114:1290–1298.

Cnop M, Hughes SJ, Igoillo-Esteve M, Hoppa MB, Sayyed F, van de Laar L, Gunter JH, de Koning EJ, Walls GV, Gray DW, Johnson PR, Hansen BC, Morris JF, Pipeleers-Marichal M, Cnop I, Clark A.: The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation. Diabetologia 2010 Feb;53:321–330.

Delang L, Guerrero NS, Tas A, Quérat G, Pastorino B, Froeyen M, Dallmeier K, Jochmans D, Herdewijn P, Bello F, Snijder EJ, de Lamballerie X, Martina B, Neyts J, van Hemert MJ, Leyssen P: Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. J Antimicrob Chemother 2014 Jun 20;dku209.

De Palma AM, Vliegen I, De Clercq E, Neyts J: Selective inhibitors of picornavirus replication. Med Res Rev 2008 Nov;28:823–884.

Dotta F, Censini S, van Halteren AGS, 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 β cells and natural killer cell insulitis in recent-onset type 1 diabetic patients. Proc Natl Acad Sci U S A 2007 Mar 20;104:5115–5120.

Drescher KM, von Herrath M, Tracy S: Enteroviruses, hygiene and type 1 diabetes: toward a preventive vaccine. Rev Med Virol 2015 Jan 1;25:19–32.

El Hiar R, Hober D, Jaidane H, Sané F, M'hadheb-Gharbi MB, Caloone D, Gharbi J, Aouni M: Prolonged viral RNA detection in the central nervous system of one-week-old Swiss albino mice following coxsackievirus B4 and echovirus 9 infection. Intervirology 2012 Mar;55:435–441.

Elmastour F, Jaidane H, Aguech-Oueslati L, Benkahla MA, Aouni M, Gharbi J, Sane F, Hober D: Immunoglobulin G-dependent enhancement of the infection with Coxsackievirus B4 in a murine system. Virulence 2016 Jul 3;7:527–535.

Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S: Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. Diabetologia 2000 Dec;43:1528–1533.

Espinoza-Jimenez A, Peon AN, Terrazas LI: Alternatively Activated Macrophages in Types 1 and 2 Diabetes. Mediators of Inflamm 2012 Dec 27;2012:e815953.

Ekoé J-M, Zimmet P. Z., Yale J-F. (2008b). The clinical syndrome and the biochemical definition. Dans The Epidemiology of Diabetes Mellitus, Second Edition Edited by Jean-Marie Ekoe´, Marian Rewers, Rhys Williams and Paul Zimmet.

Etuk, EU. Animal models for studying diabetes mellitus. Agriculture and biology journal of north America 2010 Apr 1(2): 130-134.

Farrar MA, Schreiber RD: The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. Annu Rev Immunol 1993 Apr;11:571–611.

Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P: The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. Nat Rev Immunol 2010 Aug;10:554–567.

Freimuth P, Philipson L, Carson SD: The coxsackievirus and adenovirus receptor. Curr Top Microbiol Immunol 2008 Mar;323:67–87.

Frigerio S, Junt T, Lu B, Gerard C, Zumsteg U, Holländer GA, Piali L: Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulitis. Nat Med 2002 Dec;8:1414–1420.

Frisk G, Diderholm H: Tissue culture of isolated human pancreatic islets infected with different strains of coxsackievirus B4: assessment of virus replication and effects on islet morphology and insulin release. Int J Exp Diabetes Res 2000 Mar;1:165–175.

Furuta Y, Takahashi K, Fukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, Nomura N, Egawa H, Minami S, Watanabe Y, Narita H, Shiraki K: In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. Antimicrob Agents Chemother 2002 Apr;46:977–981.

Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL: Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. Antiviral Res 2013 Nov;100. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015

Gamble DR, Taylor KW: Seasonal incidence of diabetes mellitus. Br Med J 1969 Sep 13;3:631–633.

Gassen NV, Staels W, Overmeire EV, Groef SD, Sojoodi M, Heremans Y, Leuckx G, Van de Casteele M, Van Ginderachter JA, Heimberg H, De Leu N: Concise Review: Macrophages: Versatile Gatekeepers During Pancreatic β-Cell Development, Injury, and Regeneration. Stem Cells Trans Med 2015 Apr 6;sctm.2014-0272.

Gonzalez-Mariscal L, Garay E, Lechuga S: Virus interaction with the apical junctional complex. Front Biosci (Landmark Ed) 2009 Jan 1;14:731–768.

Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol 2005 Dec;5:953–964.

Gordon S: Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol 2003 Jan;3:23–35.

Gowen BB, Wong M-H, Jung K-H, Sanders AB, Mendenhall M, Bailey KW, Furuta Y, Sidwell RW: In vitro and in vivo activities of T-705 against arenavirus and bunyavirus infections. Antimicrob Agents Chemother 2007 Sep;51:3168–3176.

Hafenstein S, Bowman VD, Chipman PR, Kelly CMB, Lin F, Medof ME, Rossmann MG: Interaction of Decay-Accelerating Factor with Coxsackievirus B3. J Virol 2007 Dec 1;81:12927–12935.

Hanafusa T, Imagawa A: Insulitis in human type 1 diabetes. Ann N Y Acad Sci 2008 Dec;1150:297–299.

Hartig PC, Madge GE, Webb SR: Diversity within a human isolate of coxsackie B4: relationship to viral-induced diabetes. J Med Virol 1983 Apr;11:23–30.

Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M: Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity 2013 Apr 18;38:792–804.

Haverkos HW, Battula N, Drotman DP, Rennert OM: Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus. Biomed Pharmacother 2003 Nov;57:379–385.

Hawkes RA: Enhancement of the infectivity of arboviruses by specific antisera produced in domestic fowls. Aust J Exp Biol Med Sci 1964 Aug;42:465–482.

Hayden FG, Hipskind GJ, Woerner DH, Eisen GF, Janssens M, Janssen PA, Andries K: Intranasal pirodavir (R77,975) treatment of rhinovirus colds. Antimicrob Agents Chemother 1995 Feb;39:290–294.

Herr RR, Jahnke JK, Argoudelis AD. The structure of streptozotocin. J Am Chem Soc 1967 Sep 89: 4808-9.

Hiemstra HS, Schloot NC, van Veelen PA, Willemen SJM, Franken KLMC, van Rood JJ, de Vries RR, Chaudhuri A, Behan PO, Drijfhout JW, Roep BO: Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Mar 27;98:3988–3991.

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 Nov 1;184:1098–1108.

Hober D, Sane F, Jaïdane H, Riedweg K, Goffard A, Desailloud 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 Apr;168:47–51.

Hober D, Chehadeh W, Weill J, Hober C, Vantyghem M-C, 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 Sep;83:2169–2176.

Hober D, Sauter P: Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. Nat Rev Endocrinol 2010 May;6:279–289.

Hodik M, Skog O, Lukinius A, Isaza-Correa JM, Kuipers J, Giepmans BNG, 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 Diab Res Care 2016 Aug 1;4:e000179.

Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvennick N: Diabetes induced by Coxsackie virus: Initiation by bystander damage and not molecular mimicry. Nat Med 1998 Jul;4:781–785.

Horwitz MS, Ilic A, Fine C, Rodriguez E, Sarvetnick N: Coxsackievirus-mediated hyperglycemia is enhanced by reinfection and this occurs independent of T cells. Virology 2003 Sep 30;314:510–520.

Horwitz MS, Evans CF, Klier FG, Oldstone MB: Detailed in vivo analysis of interferon-gamma induced major histocompatibility complex expression in the the central nervous system: astrocytes fail to express major histocompatibility complex class I and II molecules. Lab Invest 1999 Feb;79:235–242.

Hutchings PR, Cooke A: The transfer of autoimmune diabetes in NOD mice can be inhibited or accelerated by distinct cell populations present in normal splenocytes taken from young males. J Autoimmun 1990 Apr;3:175–185.

Hyöty H, Taylor KW: The role of viruses in human diabetes. Diabetologia 2002 Oct;45:1353–1361.

Hyöty H, Knip M: Developing a vaccine for Type 1 diabetes through targeting enteroviral infections. Expert Rev Vaccines 2014 Aug;13:989–999.

Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y: A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. N Engl J Med 2000 Feb 3;342:301–307.

Imagawa A, Hanafusa T, Uchigata Y, Kanatsuka A, Kawasaki E, Kobayashi T, Shimada A, Shimizu I, Toyoda T, Maruyama T, Makino H: Fulminant type 1 diabetes: a nationwide survey in Japan. Diabetes Care 2003 Aug;26:2345–2352.

Imagawa A, Hanafusa T: Pathogenesis of Fulminant Type 1 Diabetes. Rev Diabet Stud 2006 Feb;3:169–177.

Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Hayashi K, Naruse A: Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. Environ Toxicol Pharmacol 2001 Jan 1;9:71–78.

Jaïdane H, Goflard A, Gharbi J, Hober D: Vers une meilleure compréhension de la relation entre entérovirus et diabète de type 1. Virologie 2008 May;12:187–200.

Jaïdane H, Hober D: Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. Diabetes Metab 2008 Dec;34:537–548.

Jaïdane H, Sané F, Gharbi J, Aouni M, Romond MB, Hober D: Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models. Diabetes Metab Res Rev 2009 Oct;25:591–603.

Jaïdane H, Caloone D, Lobert P-E, 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 Oct;86:11151–11162.

Jaïdane H, Gharbi J, Lobert P-E, Caloone D, Lucas B, Sané F, Idziorek T, Romond MB, Aouni M, Hober D: Infection of primary cultures of murine splenic and thymic cells with coxsackievirus B4. Microbiol Immunol 2008 Jan;52:40–46.

Jaïdane H, Gharbi J, Lobert P-E, Lucas B, Hiar R, M'hadheb MB, Brilot F, Geenen V, Aouni M, Hober D: Prolonged viral RNA detection in blood and lymphoid tissues from coxsackievirus B4 E2 orally-inoculated Swiss mice. Microbiol Immunol 2006 Dec;50:971–974.

Julander JG, Shafer K, Smee DF, Morrey JD, Furuta Y: Activity of T-705 in a Hamster Model of Yellow Fever Virus Infection in Comparison with That of a Chemically Related Compound, T-1106. Antimicrob Agents Chemother 2009 Jan 1;53:202–209.

Julander JG, Smee DF, Morrey JD, Furuta Y: Effect of T-705 treatment on western equine encephalitis in a mouse model. Antiviral Res 2009 Jun;82:169–171.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE: Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. J Clin Invest 1969 Nov;48:2129–2139.

Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J: Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes Care 2000 Oct;23:1516–1526.

Kawai T, Akira S: TLR signaling. Cell Death Differ 2006 May;13:816–825.

Kearns GL, Bradley JS, Jacobs RF, Capparelli EV, James LP, Johnson KM, Abdel-Rahman SM: Single dose pharmacokinetics of pleconaril in neonates. Pediatric Pharmacology Research Unit Network. Pediatr Infect Dis J 2000 Sep;19:833–839.

Kibrick S, Benirschke K: Severe generalized disease (encephalohepatomyocarditis) occurring in the newborn period and due to infection with Coxsackie virus, group B; evidence of intrauterine infection with this agent. Pediatrics 1958 Nov;22:857–875.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. (Eds.). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. 2012 Aug pp. 783-1197.

Klein M, Hadaschik D, Zimmermann H, Eggers HJ, Nelsen-Salz B: The picornavirus replication inhibitors HBB and guanidine in the echovirus-9 system: the significance of viral protein 2C. J Gen Virol 2000 Apr;81:895–901.

Knip M: Environmental triggers and determinants of beta-cell autoimmunity and type 1 diabetes. Rev Endocr Metab Disord 2003 Sep;4:213–223.

Laconi S, Madeddu MA, Pompei R: Study of the biological activity of novel synthetic compounds with antiviral properties against human rhinoviruses. Molecules 2011 Apr 26;16:3479–3487.

Lacroix C, Laconi S, Angius F, Coluccia A, Silvestri R, Pompei R, Neyts J, Leyssen P: In vitro characterisation of a pleconaril/pirodavir-like compound with potent activity against rhinoviruses. Virol J 2015 Jul;12:106.

Larsson PG, Lakshmikanth T, Laitinen OH, Utorova R, Jacobson S, Oikarinen M, Domsgen E, Koivunen MR, Chaux P, Devard N, Lecouturier V, Almond J, Knip M, Hyöty H, Flodström-Tullberg M: A preclinical study on the efficacy and safety of a new vaccine against Coxsackievirus B1 reveals no risk for accelerated diabetes development in mouse models. Diabetologia 2015 Feb;58:346–354.

Li Q, Yafal AG, Lee YM, Hogle J, Chow M: Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure of these sequences at physiological temperature. J Virol 1994 Jun;68:3965–3970.

Lin J-Y, Chen T-C, Weng K-F, Chang S-C, Chen L-L, Shih S-R: Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. J Biomed Sci 2009 Nov 20;16:103.

Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, Stiles JK: CXCL10/IP-10 in Infectious Diseases Pathogenesis and Potential Therapeutic Implications. Cytokine Growth Factor Rev 2011 Jun;22:121–130.

Loh J, Chu DT, O'Guin AK, Yokoyama WM, Virgin HW: Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. J Virol 2005 Jan;79:661–667.

Machado DG, Cunha MP, Neis VB, Balen GO, Colla A, Grando J, Brocardo PS, Bettio LE, Capra JC, Rodrigues AL: Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. Pharmacol Biochem Behav 2012 Dec;103:220–229.

Marjomäki V, Turkki P, Huttunen M: Infectious Entry Pathway of Enterovirus B Species. Viruses 2015 Dec 7;7:6387–6399.

McDuffie E, Obert L, Chupka J, Sigler R: Detection of cytokine protein expression in mouse lung homogenates using suspension bead array. J Inflamm 2006 Nov;3:15.

Mendenhall M, Russell A, Smee DF, Hall JO, Skirpstunas R, Furuta Y, Gowen BB: Effective Oral Favipiravir (T-705) Therapy Initiated after the Onset of Clinical Disease in a Model of Arenavirus Hemorrhagic Fever. PLOS Negl Trop Dis 2011 Oct 11;5:e1342.

Muckelbauer JK, Kremer M, Minor I, Diana G, Dutko FJ, Groarke J, Pevear DC, Rossmann MG: The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 A resolution. Structure 1995 Jul 15;3:653–667.

Nair S, Leung K-C, Rawlinson WD, Naing Z, Craig ME: Enterovirus infection induces cytokine and chemokine expression in insulin-producing cells. J Med Virol 2010 Nov;82:1950–1957.

Nakagawa Y, Shimada A, Oikawa Y, Irie J, Shigihara T, Tsumura K, Narumi S, Saruta T: Two cases of “fulminant” type 1 diabetes suggesting involvement of autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 2003 Nov;1005:359–361.

Nicoletti F, Conget I, Di Mauro M, Di Marco R, Mazzarino MC, Bendtzen K, Messina A, Gomis R: Serum concentrations of the interferon-gamma-inducible chemokine IP-10/CXCL10 are augmented in both newly diagnosed Type I diabetes mellitus patients and subjects at risk of developing the disease. Diabetologia 2002 Aug;45:1107–1110.

Oberste MS: Comparative genomics of the coxsackie B viruses and related enteroviruses. Curr Top Microbiol Immunol 2008;323:33–47.

Okamoto H, Takasawa S: Recent advances in physiological and pathological significance of NAD+ metabolites: roles of poly(ADP-ribose) and cyclic ADP-ribose in insulin secretion and diabetogenesis. Nutr Res Rev 2003 Dec;16:253–266.

Otto MJ, Fox MP, Fancher MJ, Kuhrt MF, Diana GD, McKinlay MA: In vitro activity of WIN 51711, a new broad-spectrum antipicornavirus drug. Antimicrob Agents Chemother 1985 Jun;27:883–886.

Pallansh, M. A., R. P. Roos, D. M. Knipe. 2006. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Fields Virology 2007 (6th Ed.). Lippincott Williams and Wilkins, PA, USA, 839-894.

Pane JA, Coulson BS: Lessons from the mouse: potential contribution of bystander lymphocyte activation by viruses to human type 1 diabetes. Diabetologia 2015 Jun;58:1149–1159.

Pincus SE, Diamond DC, Emini EA, Wimmer E: Guanidine-selected mutants of poliovirus: mapping of point mutations to polypeptide 2C. J Virol 1986 Feb;57:638–646.

Ramsingh AI, Chapman N, Tracy S: Coxsackieviruses and diabetes. Bioessays 1997 Sep;19:793–800.

Richer MJ, Lavallée DJ, Shanina I, Horwitz MS: Toll-Like Receptor 3 Signaling on Macrophages Is Required for Survival Following Coxsackievirus B4 Infection. PLoS ONE 2009 Jan 5;4. DOI: 10.1371/journal.pone.0004127

Robak T, Gladalska A, Stepień H: The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. Eur Cytokine Netw 1998 Jun;9:145–154.

Rocha-Pereira J, Jochmans D, Dallmeier K, Leyssen P, Nascimento MSJ, Neyts J: Favipiravir (T-705) inhibits in vitro norovirus replication. Biochem Biophys Res Commun 2012 Aug 10;424:777–780.

Roep BO, Kleijwegt FS, van Halteren AGS, Bonato V, Boggi U, Vendrame F, Marchetti P, Dotta F: Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes. Clin Exp Immunol 2010 Mar;159:338–343.

Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ: Picornavirus-receptor interactions. Trends Microbiol 2002 Jul;10:324–331.

Saunders K, King AM, McCahon D, Newman JW, Slade WR, Forss S: Recombination and oligonucleotide analysis of guanidine-resistant foot-and-mouth disease virus mutants. J Virol 1985 Dec 1;56:921–929.

Sauter P, Lobert P-E, Lucas B, Varela-Calvino R, Alm G, Wattre P, Hober D: Role of the capsid protein VP4 in the plasma-dependent enhancement of the Coxsackievirus B4E2-infection of human peripheral blood cells. Virus Res 2007 May;125:183–190.

Schulte BM, Kramer M, Ansems M, Lanke KHW, van Doremalen N, Piganelli JD, Bottino R, Trucco M, Galama JMD, Adema GJ, van Kuppeveld FMJ: Phagocytosis of Enterovirus-Infected Pancreatic β-Cells Triggers Innate Immune Responses in Human Dendritic Cells. Diabetes 2010 May;59:1182–1191.

Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F: A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science 2012 Apr 6;336:86–90.

Sedger LM, McDermott MF: TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. Cytokine Growth Factor Rev 2014 Aug;25:453–472.

Senior K: FDA panel rejects common cold treatment. Lancet Infect Dis 2002 May;2:264.

Serreze DV, Wasserfall C, Ottendorfer EW, Stalvey M, Pierce MA, Gauntt C, O'Donnell B, Flanagan JB, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA: Diabetes Acceleration or

Prevention by a Coxsackievirus B4 Infection: Critical Requirements for both Interleukin-4 and Gamma Interferon. J Virol 2005 Jan 15;79:1045–1052.

Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, Kasuga A, Saruta T, Narumi S: Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. Diabetes Care 2001 Mar;24:510–515.

Smither SJ, Eastaugh LS, Steward JA, Nelson M, Lenk RP, Lever MS: Post-exposure efficacy of oral T-705 (Favipiravir) against inhalational Ebola virus infection in a mouse model. Antiviral Res 2014 Apr;104:153–155.

Sun L, Meijer A, Froeyen M, Zhang L, Thibaut HJ, Baggen J, George S, Vernachio J, van Kuppeveld FJ, Leyssen P, Hilgenfeld R, Neyts J, Delang L: Antiviral activity of broad-spectrum and enterovirus-specific inhibitors against clinical isolates of enterovirus D68. Antimicrob Agents Chemother 2015 Sep 14;AAC.01375-15.

Takeda K, Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol 2005 Jan;17:1–14.

Takeuchi O, Akira S: Innate immunity to virus infection. Immunol Rev 2009 Jan;227:75–86.

Takeuchi O, Akira S: Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 2010 Mar 19;140:805–820.

Tan CW, Lai JKF, Sam I-C, Chan YF: Recent developments in antiviral agents against enterovirus 71 infection. J Biomed Sci 2014 Feb;21:14.

Tanaka S, Nishida Y, Aida K, Maruyama T, Shimada A, Suzuki M, Shimura H, Takizawa S, Takahashi M, Akiyama D, Arai-Yamashita S, Furuya F, Kawaguchi A, Kaneshige M, Katoh R, Endo T, Kobayashi T: Enterovirus infection, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10), and CXCR3 circuit: a mechanism of accelerated beta-cell failure in fulminant type 1 diabetes. Diabetes 2009 Oct;58:2285–2291.

Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L: Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. Infect Genet Evol 2013 Mar;14:282–293.

Tarcan A, Ozbek N, Gürakan B: Bone marrow failure with concurrent enteroviral infection in a newborn. Pediatr Infect Dis J 2001 Jul;20:719–721.

Taub DD, Longo DL, Murphy WJ: Human interferon-inducible protein-10 induces mononuclear cell infiltration in mice and promotes the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues and human peripheral blood lymphocytes-SCID mice. Blood 1996 Feb 15;87:1423–1431.

Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J: Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. J Clin Invest 1995 Mar;95:1370–1376.

Ulferts R, van der Linden L, Thibaut HJ, Lanke KHW, Leyssen P, Coutard B, De Palma AM, Canard B, Neyts J, van Kuppeveld FJ: Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Fluoxetine Inhibits Replication of Human Enteroviruses B and D by Targeting Viral Protein 2C. Antimicrob Agents Chemother 2013 Apr;57:1952–1956.

Uno S, Imagawa A, Saisho K, Okita K, Iwahashi H, Hanafusa T, Shimomura I: Expression of chemokines, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) and CXCR3 in the inflamed islets of patients with recent-onset autoimmune type 1 diabetes. Endocr J 2010 Oct;57:991–996.

Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG: Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. Physiol Rev 2011 Jan;91:79–118.

Vance LM, Moscufo N, Chow M, Heinz BA: Poliovirus 2C region functions during encapsidation of viral RNA. J Virol 1997 Nov;71:8759–8765.

Van Furth R, Cohn ZA: The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J Exp Med 1968 Sep 1;128:415–435.

Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS : Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. Diabetes 1996 Jul;45:926–933.

Verlinden Y, Cuconati A, Wimmer E, Rombaut B: The antiviral compound 5-(3,4-dichlorophenyl) methylhydantoin inhibits the post-synthetic cleavages and the assembly of poliovirus in a cell-free system. Antiviral Res 2000 Oct;48:61–69.

Viskari HR, Koskela P, Lönnrot M, Luonuansuu S, Reunanen A, Baer M, Hyöty H: Can enterovirus infections explain the increasing incidence of type 1 diabetes. Diabetes Care 2000 Mar;23:414–416.

Wu KX, Ng MM-L, Chu JJH: Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71. Drug Discov Today 2010 Dec;15:1041–1051.

Xagorari A, Chlichlia K: Toll-Like Receptors and Viruses: Induction of Innate Antiviral Immune Responses. Open Microbiol J 2008 May 14;2:49–59.

Yan N, Chen ZJ: Intrinsic Antiviral Immunity. Nat Immunol 2012 Feb 16;13:214–222.

Yang M, Büsche G, Ganser A, Li Z: Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects. Ann Hematol 2013 May;92:587–594.

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 Feb;47:225–239.

Yokota S, Okabayashi T, Fujii N: The Battle between Virus and Host: Modulation of Toll-Like Receptor Signaling Pathways by Virus Infection. Mediators of Inflamm 2010 Jun 16;2010:e184328.

Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL: Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. N Engl J Med 1979 May 24;300:1173–1179.

146 Yoon JW, London WT, Curfman BL, Brown RL, Notkins AL: Coxsackie virus B4 produces transient diabetes in nonhuman primates. Diabetes 1986 Jun;35:712–716.

Zuo J, Quinn KK, Kye S, Cooper P, Damoiseaux R, Krogstad P: Fluoxetine Is a Potent Inhibitor of Coxsackievirus Replication. Antimicrob Agents Chemother 2012 Sep;56:4838–4844.

Annexe : articles publiés

Benkahla, M. A., Sane, F., Desailloud, R. & Hober, D. Exposure of Piglets to Enteroviruses Investigated by an Immunoassay Based on the EV-G1 VP4 Peptide. Intervirology 59, 69–73 (2016).

Elmastour, F., Jaidane H., Aguech-Oueslati L., **Benkahla M.A.,** Aouni M., Gharbi J., Sane F., Hober D.. Immunoglobulin G-dependent enhancement of the infection with Coxsackievirus B4 in a murine system. Virulence 7, 527–535 (2016).

Elmastour, F. Jaidane H., **Benkahla M.A.**, 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 (2016). doi:10.1080/21505594.2016.1252018