

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**  
*Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*  
*Spécialité : Microbiologie, maladies transmissibles et hygiène*

Présentée et soutenue publiquement par

**MARIE GLENET**

Le 9 juillet 2020

---

**Impact des ARN génomiques des Entérovirus-B tronqués en région  
5'non-codante sur l'activation de la réponse interféron de type I  
dans les cardiomyocytes humains**

---

Thèse dirigée par **M. LE PROFESSEUR LAURENT ANDREOLETTI**

## JURY

M. Laurent ANDREOLETTI, Champagne Ardennes, M. Alain DOGLIO,	Professeur (PU-PH) <b>Directeur de thèse</b> MCU-PH, <b>Rapporteur</b>	CHU de Reims – Université de Reims CHU de Nice,
M. Jean-Claude SIRARD,	Directeur de Recherche, <b>Rapporteur</b>	Institut Pasteur Lille, INSERM
Mme Anastasia KOMAROVA,	Chargée de Recherche, <b>Examineur</b>	Institut Pasteur Paris - CNRS UMR3569,
Mme Amélie SERVETTAZ,	Professeur (PU-PH) <b>Présidente du jury</b>	CHU de Reims – Hôpital Robert Debré,

## Remerciements

A l'issu de ces années de recherche, je suis convaincue que la thèse est un travail d'équipe. Il est certain que je n'aurai jamais pu réaliser cette thèse sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifesté à l'égard de mes recherches, m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ».

*A Monsieur le Professeur Laurent Andreoletti,*

En premier lieu je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Professeur Laurent Andreoletti de m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer cette thèse. Votre savoir, vos conseils, vos intuitions et votre disponibilité ont permis la réalisation de cette thèse et ont été de véritables atouts pour mon développement personnel et professionnel. En espérant que ces travaux retranscrivent la qualité de votre enseignement. Enfin j'ai été extrêmement sensible à vos qualités humaines, d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Soyez assuré de ma plus profonde reconnaissance, je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

Mes remerciements vont également aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger la pertinence et la qualité de mes travaux ;

*A Monsieur le Professeur Alain Doglio,*

Vous me faites l'honneur d'évaluer ce travail de thèse d'université en tant que rapporteur. Je vous en remercie. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

*A Monsieur le Docteur Jean-Claude Sirard,*

Je suis très honorée que vous ayez accepté d'apporter votre expertise pour juger la qualité de mon travail. Soyez assuré de mes sincères remerciements.

*A Madame le Professeur Amélie Servetazz,*

Je vous exprime ma gratitude d'avoir accepté d'être présidente de mon jury de thèse et d'avoir examiné mon travail de thèse. Soyez assurée de l'honneur que vous me faites.

*A Madame le Docteur Anastasia V. Komarova,*

Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger dans ce jury de thèse. Veuillez recevoir mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de collaborer avec notre équipe de recherche. Merci pour votre enseignement et vos conseils qui ont été d'une aide précieuse. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

Je remercie toutes les personnes qui ont permis la réalisation des expérimentations, pour leur disponibilité et leurs conseils : Romain Rivet, Frédéric Velard, Aurélie Dupont-Deshorgue, Céline Charpentier, Valérie Najburg.

Je remercie mes collègues et avant tout amis pour m'avoir soutenue et aidée à relativiser les problèmes rencontrés au cours de ces 3 années : Céline et Caroline, merci pour votre bienveillance à mon égard et tous ces bons moments partagés ; et tous mes encouragements à Cédric pour sa thèse.

A l'ensemble du personnel de l'EA 4684 (CardioVir),  
Pour leur soutien quotidien et leur aide dans la réalisation de cette thèse d'université. Merci à Domitille Callon qui m'a permis de suivre ma première autopsie, pour son implication dans ces travaux et son avant-garde sur les « thresholds ». Merci à Fatma Berri pour ses précieux conseils et son partage de la vie aux « States ». Tous mes encouragements à mon petit Scarabée pour sa thèse et mes sincères remerciements pour sa gentillesse et son soutien sans failles. Tu as su me « bonbon » motiver. Je vous souhaite à tous une bonne continuation dans la réalisation de vos projets tant professionnels que personnels.

*Au Docteur Yohan N'Guyen*

Un grand merci pour tes précieux conseils, ton soutien et tes encouragements. Merci pour nos séances de psychanalyses particulières. J'ai pu te confier mes doutes et mes difficultés en toute confiance. Je te témoigne ici toute mon amitié et toute ma reconnaissance. *A + sous le bus !*

*A Lord Popo de Glencoe*

Je te remercie pour ton soutien tout au long de ces années. Merci pour tes réflexions scientifiques et tes expertises qui m'ont aidé à mener à bien ce projet. Ton accompagnement dans nos sorties culturelles, touristiques et surtout nos ravitaillements éthyliques. Tes chants lyriques sur les airs de La Traviata m'auront bercé pendant ces 3 longues années de thèse. Tu as su faire preuve de patience face à ma « chiantise inégalée » qui a allongé chaque jour un peu plus mon ardoise. Je te souhaite une bonne continuation et réussite dans la réalisation de tes projets futurs et dans ta vie personnelle.

*A ma Nono,*

Voisine de bureau pendant ces années de thèse et bien plus...Merci pour ton dévouement sans faille et tout ton investissement. Sans ton aide technique et ton soutien la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible. Tu as été à mon écoute dans mes périodes de doute et tu m'as toujours soutenu dans les moments les plus difficiles. A nous deux, chèvre et buse, nous aurons été des bêtes de ménage, sans compter sur mon initiation au patois local avec le passage de « la bâche ». Je te souhaite tout le meilleur aussi bien dans ta vie personnelle que dans ta carrière professionnelle.

*A mes amis,*

Juliette, j'ai eu le plaisir de te rencontrer au laboratoire de laquelle est née une belle amitié. Merci pour ta franchise et ton soutien indéfectible tant dans ma vie privée que professionnelle. Je te témoigne ici toute mon amitié, toute ma reconnaissance et toute mon affection.

Charlotte, pour tous ces bons moments passés ensemble et pour les futurs à venir.  
Merci pour tout ton soutien et de ton amitié.

Léa, malgré la distance et avec ton expérience, tu as toujours été d'un grand soutien.

*A Hugo,*

Je te remercie de ton soutien quotidien indéfectible et de ton optimisme que ce soit à l'égard de mon travail ou de notre vie personnelle.

*A ma famille,*

Je remercie tout particulièrement les membres de ma famille pour leurs encouragements. Merci à vous tous de m'avoir soutenue et supportée tout au long de ce cursus.

Enfin, à tous ceux que j'oublie et qui ont fait un bout de chemin avec moi, je vous adresse un grand merci.

---

## **Impact des ARN génomiques des Entérovirus-B tronqués en région 5' non-codante sur l'activation de la réponse interféron de type I dans les cardiomyocytes humains**

---

Des ARN génomiques d'Entérovirus du groupe-B (EV-B)) tronqués en région 5' non-codante ont été associés au développement de cardiomyopathies humaines. L'impact de ces ARN génomiques viraux sur l'activation de la réponse interféron (IFN) de type I dans les cellules cibles reste inconnu. Dans des cas de myocardite humaine ou expérimentale à EV-B, nous avons identifié par RACE-PCR différentes formes d'ARN tronqués dont les proportions étaient corrélées positivement ou négativement aux niveaux IFN- $\beta$  dans les tissus cardiaques. Par transfection de formes synthétiques complètes ou tronquées d'ARN CV-B3 dans des proportions imitant celles observées chez les patients dans des cardiomyocytes, nous avons démontré que la structure "d" du domaine I de l'ARN EV-B possède un motif immunomodulateur de cinq nucléotides responsable de l'induction de la voie IFN- $\beta$ . En utilisant des cellules STING-37 knockdown pour chaque RLR (RIG-I ou MDA5), nous avons montré que la détection des formes d'ARN 5'TD caractérisées par la perte de ce motif nucléotidique était dépendante de RIG-I et associée à un rétrocontrôle négatif de LGP2, ce qui entraîne une diminution de la réponse IFN- $\beta$  dans les cellules infectées. En revanche, la détection immunitaire innée des formes FL ou 5'TD avec une tige-boucle "d" conservée était dépendante de MDA5 et associée à des niveaux plus élevés d'IFN- $\beta$ . Les délétions naturelles de nucléotides affectant le domaine I de la région 5'NC du génome EV-B modulent la détection immunitaire de l'ARN viral par les RLRs. Ces données ouvrent de nouvelles perspectives d'immunothérapie ciblées visant à induire une clairance des tissus cardiaques humains infectés par les EV-B.

---

**Mots-clés :** Entérovirus du groupe B, Délétion génomique en région 5'NC, Myocardite aiguë, Interférons de type 1, Récepteurs de type RIG-I, Immunité innée

---

---

## **Impact of 5'terminally deleted Group-B Enterovirus genomic RNA forms on type I interferon pathway induction in human cardiomyocytes**

---

Group-B Enterovirus (EV-B) genomic RNA forms with deletions in 5' non-coding region (5'NC) have been associated with the development of acute or chronic human cardiomyopathies. The impact of 5'terminally deleted (5'TD) viral genomic RNA populations on type I interferon response activation in target cells remains unknown. In human and murine cardiac biopsies collected during EV-B myocarditis, we identified by a RACE-PCR approach different natural 5'NC deleted RNA forms whose proportions were correlated positively or negatively to IFN- $\beta$  levels in cardiac tissues. Through transfection of synthetic full-length or 5' TD CV-B3 RNA forms alone or associated in proportions mimicking those observed in acute viral populations into human cardiomyocytes, we demonstrated that stem-loop "d" structure of EV-B RNA domain I possesses an immunomodulatory five nucleotide motif responsible for IFN- $\beta$  pathway induction. Using STING-37 knockdown cells for each RLRs (RIG-I or MDA5), we evidenced that the sensing of 5'TD RNA forms characterized by the loss of this nucleotide motif was RIG-I-dependent and associated with an LGP2 negative feedback, resulting in IFN- $\beta$  response decrease in infected cells. By contrast, the innate immune sensing of FL or 5'TD forms with conserved stem-loop "d" structure was MDA5-dependent sensing and associated with higher IFN- $\beta$  levels. Natural nucleotide deletions affecting domain I of 5'NC region of EV-B genome modulate the immune sensing of viral RNA by RLRs. These data should stimulate the development of target immunotherapies to restore an efficient antiviral innate immune response and potentially to achieve a viral clearance of human EV-B infected heart tissues.

---

**Key words:** Group B Enterovirus, 5'NC genomic deletions, Acute myocarditis, type-1 Interferons, RIG-I-like-receptors, Innate immunity

---

**Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**  
**Spécialité : Microbiologie, maladies transmissibles et hygiène**

---

Université de Reims Champagne-Ardenne  
CardioVir – EA 4684  
51 Rue Cognacq Jay - 51100 Reims

# Table des matières

Remerciements.....	2
Résumé.....	5
Table des matières.....	6
Liste des illustrations.....	9
Liste des tableaux.....	11
Liste des abréviations.....	12
INTRODUCTION GENERALE.....	14
PREMIERE PARTIE : DONNES BIBLIOGRAPHIQUES.....	20
I. LES ENTEROVIRUS.....	21
A. Introduction.....	21
B. Taxonomie.....	22
C. Structure.....	25
1. Structure du virion et propriétés physicochimiques.....	25
2. Structure de l'ARN génomique.....	28
D. CYCLE DE REPLICATION VIRALE.....	31
1. Attachement sur le récepteur.....	32
2. Traduction de l'ARN viral.....	34
3. Réplication de l'ARN viral.....	36
4. Assemblage et libération du virion.....	40
E. EVOLUTION ET ADAPTATION GENETIQUE DES ENTEROVIRUS.....	41
1. Mutations/Recombinaisons.....	41
2. Quasi-espèces et dynamique d'évolution des populations virales.....	43
II. INFECTIONS HUMAINES A ENTEROVIRUS.....	45
A. EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS À ENTEROVIRUS.....	45
1. Epidémiologie des infections à Entérovirus dans le monde.....	45
2. Epidémiologie des infections à Entérovirus en France.....	46
B. PHYSIOPATHOLOGIE GENERALE DES INFECTIONS À ENTEROVIRUS	
47	
1. Pouvoir pathogène chez l'Homme : infections aiguës.....	47
2. Pouvoir pathogène chez l'Homme : infections chroniques ou persistantes	
49	

C.	MYOCARDITE AIGUE .....	50
1.	Définition .....	50
2.	Symptômes cliniques et évolution .....	50
3.	Diagnostic positif d'une myocardite aigüe et examens complémentaires.....	52
D.	CARDIOMYOPATHIE DILATEE.....	53
	Classification et étiologies des cardiomyopathies dilatées (CMD) .....	54
E.	PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MYOCARDITE AIGUE À ENTEROVIRUS JUSQU' À LA CARDIOMYOPATHIE DILATEE .....	55
1.	Phase de myocardite aigüe .....	56
2.	Phase de myocardite subaigüe .....	58
3.	Guérison ou chronicisation de la myocardite.....	59
III.	REPONSE IMMUNITAIRE A ENTEROVIRUS .....	60
A.	CARACTERES GENERAUX DE LA REPONSE IMMUNITAIRE AU COURS DE L'INFECTION PAR LES ENTEROVIRUS HUMAINS.....	60
B.	L'IMMUNITE CELLULAIRE AU COURS DE L'INFECTION PAR LES ENTEROVIRUS HUMAINS.....	62
C.	L'IMMUNITE HUMORALE AU COURS DE L'INFECTION PAR LES ENTEROVIRUS HUMAINS.....	62
D.	IMMUNITE INNEE A ENTEROVIRUS.....	63
1.	Détection des Entérovirus par les récepteurs Toll-like ou Toll-like receptors (TLRs) .....	63
2.	Détection des Entérovirus par les récepteurs RIG-I ou RIG-I-like receptors (RLRs) .....	65
3.	Les interférons (IFN) ; des effecteurs principaux de la réponse antivirale	74
E.	ECHAPPEMENT DES ENTEROVIRUS DU GROUPE B A LA REPONSE IMMUNE INNEE .....	79
1.	Modulation de l'expression génique de la cellule infectée.....	79
2.	Interférence des Entérovirus avec la voie des <i>Toll-like-Receptors</i> .....	80
3.	Interférence des Entérovirus avec les récepteurs RLRs .....	80
4.	Interférence des Entérovirus avec la voie des IFNs .....	82
IV.	DECOUVERTE DES FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC DANS LES CELLULES OU TISSUS CARDIAQUES HUMAINS ET PERSISTANCE VIRALE ...	85
A.	MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DES FORMES TRONQUEES .....	85
1.	Mise en évidence <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (modèle murin).....	85
2.	Mise en évidence chez l'homme .....	86
B.	FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC ET GENOMES VIRAUX DEFECTIFS (DVG) CHEZ LES VIRUS A ARN.....	86
1.	Impact sur la diversité génétique.....	88
2.	Impact sur la recombinaison et les génomes viraux défectifs (DVG) .....	89

C.	IMPACT DES FORMES TRONQUEES SUR LA PATHOGENICITE.....	90
1.	Impact sur la réplication génomique.....	90
2.	Production de protéines virales .....	93
D.	DECOUVERTE DES FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC DANS LES CELLULES OU TISSUS CARDIAQUES HUMAINS ET PERSISTANCE VIRALE	93
E.	IMPACT DES FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC ET DES GENOMES VIRAUX DEFECTIFS SUR LE PHENOTYPE CLINIQUE ET LA SEVERITE DES PATHOLOGIES .....	94
F.	IMPACT DES FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC SUR LA RECONNAISSANCE PAR LES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE.....	96
1.	Génomomes viraux défectifs et reconnaissance par le système immunitaire	96
2.	Génomomes viraux défectifs et vaccination .....	97
	HYPOTHESES.....	99
	OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE.....	102
	DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX ORIGINAUX.....	105
V.	Article n°1 : Les populations majoritaires d'Entérovirus du groupe B (EV-B) tronquées à l'extrémité 5'terminale modulent la réponse IFN de type I chez les patients atteints de myocardite aiguë et in vitro dans les cardiomyocytes humains en culture.....	106
VI.	Article n°2 : Les populations de virus Coxsackie-B3 naturellement tronquées dans le domaine-I (« Cloverleaf ») de l'ARN génomique régulent l'activation de la voie des interférons de type I au cours de la myocardite et de la pancréatite aiguë chez la souris DBA2/J.....	146
VII.	Article n° 3: La reconnaissance des ARN génomiques d'EV-B majoritairement tronquées en région 5'NC dépendante de RIG-I inhibe la réponse interféron de type I.....	193
	DISCUSSION GENERALE.....	231
	CONCLUSION GENERALE.....	238
	PERSPECTIVES.....	240
	REFERENCES.....	243
	ANNEXE.....	279

## Liste des illustrations

FIGURE 1: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENOME DES ENTEROVIRUS PRESENTANT 2 ORFs.....	22
FIGURE 2: ANALYSE MOLECULAIRE PHYLOGENETIQUE DES ESPECES D'ENTEROVIRUS A A D ET DE RHINOVIRUS A A C PATHOGENES CHEZ L'HOMME.....	24
FIGURE 3 : ORGANISATION DE LA CAPSIDE DES ENTEROVIRUS. ....	27
FIGURE 4: ORGANISATION SCHEMATIQUE DE L'ARN GENOMIQUE DES ENTEROVIRUS. ....	29
FIGURE 5: ORGANISATION DES TIGES-BOUCLES DE LA REGION 5'NON CODANTE DES ENTEROVIRUS. ....	30
FIGURE 6: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REGION 3'NON-CODANTE. ....	31
FIGURE 7: CYCLE DE REPLICATION GENOMIQUE DES ENTEROVIRUS.....	32
FIGURE 8: CLIVAGES PROTEOLYTIQUES POST-TRADUCTIONNELS PERMETTANT LA MATURATION DE LA POLYPROTEINE ENTEROVIRALE. ....	36
FIGURE 9: SYNTHÈSE DES BRINS D'ARN ANTI-GENOMIQUES ET GENOMIQUES. ....	40
FIGURE 10: MECANISMES DE RECOMBINAISON DES ENTEROVIRUS. ....	43
FIGURE 11: INFECTIONS A ENTEROVIRUS EN FRANCE DU 1ER JANVIER 2011 AU 11 JUIN 2019. ....	47
FIGURE 12: PATHOLOGIES HUMAINES DUES AUX ENTEROVIRUS. CV COXSACKIE VIRUS, EV ENTEROVIRUS <sup>10</sup> . ....	49
FIGURE 13: EVOLUTION DES INFECTIONS CARDIAQUES HUMAINES A ENTEROVIRUS. ....	52
FIGURE 14: MECANISMES IMMUNO-PATHOLOGIQUES DEVELOPPES AU COURS DE LA MYOCARDITE A ENTEROVIRUS ET SON EVOLUTION VERS LA MYOCARDITE CHRONIQUE ET LE STADE CLINIQUE DE CARDIOMYOPATHIE DILATEE (CMD). ....	56
FIGURE 15: ENTREE DU VIRUS COXSACKIE B3 DANS LA CELLULE CIBLE ET CYCLE DE REPLICATION GENOMIQUE. ....	57
FIGURE 16: PHYSIOLOGIE DES INFECTIONS A ENTEROVIRUS. ....	60
FIGURE 17: LES VOIES DE SIGNALISATIONS DES TLRs IMPLIQUEES DANS LA REPONSE ANTIVIRALE.....	64
FIGURE 18: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES STRUCTURES DES RIG-I LIKE RECEPTORS (RLRs) ET LEUR ADAPTATEUR MAVS .....	67
FIGURE 19: ACTIVATION DE L'ACIDE RETINOIQUE INDUCTIBLE GENE 1 (RIG-I) PAR LIAISON DE L'ACIDE RIBONUCLEIQUE VIRAL (ARN).....	68
FIGURE 20 : VOIE DE SIGNALISATION DE MDA5. ....	71
FIGURE 21: LA VOIE DE SIGNALISATION RIG-I / MDA5. ....	73
FIGURE 22: LES DIFFERENTS TYPES D'INTERFERONS ET LEUR VOIE DE SIGNALISATION. ....	74
FIGURE 23: PRODUCTION D'INTERFERON DE TYPE I LORS D'UNE INFECTION VIRALE. ....	76
FIGURE 24: LE ROLE DES IFN DE TYPE I LORS D'UNE L'INFECTION VIRALE AU FIL DU TEMPS. ....	77
FIGURE 25: MECANISMES ET SITES D'ACTION DES ENTEROVIRUS INHIBANT LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE MEDIEE PAR LES PRR.....	81
FIGURE 26: SCHEMATISATION DES STRATEGIES D'EVASION DES EVs DANS LES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE. ....	84
FIGURE 27: DIFFERENTES CLASSES DE DVGs.....	88
FIGURE 28: GENERATION DES DIFFERENTES CLASSES D'ARN DEFECTUEUX.....	89

FIGURE 29: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SITES DE FIXATION DES FACTEURS DE LA REPLICATION VIRALE SUR LA STRUCTURE EN FEUILLE DE TREFLE EN REGION 5'NC..... 91

FIGURE 30: STRATEGIES D'EVASION DES ENTEROVIRUS A LA VOIE DE SIGNALISATION DES IFNS MEDIEE PAR LES TLRs ET RLRs. .... 97

## Liste des tableaux

TABLEAU 1: LES ENTEROVIRUS PATHOGENES POUR L'HOMME : ESPECES ET SEROTYPES. .	24
TABLEAU 2: RECEPTEURS CELLULAIRES DE CERTAINS EV. ....	33
TABLEAU 3: PROPRIETES ET FONCTIONS DES PROTEINES VIRALES DES ENTEROVIRUS. ....	35
TABLEAU 4: FACTEURS CELLULAIRES ET VIRAUX IMPLIQUES DANS LA REPLICATION GENOMIQUE DES ENTEROVIRUS .....	38

## Liste des abréviations

3D<sup>pol</sup> : 3D polymérase  
3'NC : 3'non-codante  
5'NC : 5' non-codante  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
BEM : biopsie endomyocardique  
CAR : Coxsackie Adenovirus receptor  
CD : *Cluster differentiation*  
CMD : cardiomyopathie dilatée  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA : cellule présentatrice d'antigènes  
*Cres* : *Cis-active RNA elements*  
CRP : C réactive protéine  
CV : Coxsackievirus  
DAF : *Decay Accelerating Factor*  
DTDVG : Diamètre TéléDiastolique du Ventricule Gauche  
DVG : *Defective Viral Genome*, Génomes viraux défectifs  
ECG : ElectroCardioGramme  
ECP : Effet CytoPathogène  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
EV : Enterovirus  
FEVG : fraction d'éjection du Ventricule Gauche  
GALT : tissu lymphoïde associé aux intestins  
HHV-6 : Human Herpes Virus 6  
IFN- $\alpha$  : Interféron  $\alpha$   
IFN- $\beta$  : Interféron  $\beta$   
IL 6 : Interleukine 6  
IL10 : Interleukine 10  
IRES : Internal Ribosome Entry Site  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
MAE : Myocardite Auto-immune Expérimentale

MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated protein 5  
NGS : séquençage de nouvelle génération  
NK : *Natural Killer*  
PABP : *poly(A)-binding proteins*  
PCBP : *poly (C)-binding proteins*  
PCR : Polymerase Chain reaction  
PCR MS : PCR couplée à une analyse par spectroscopie de masse  
PVB19 : Parvovirus B19  
RACE PCR : amplification rapide des terminaisons de l'ADN complémentaire  
RT PCR : PCR temps réel  
RIG- I : *retinoic acid-inducible gene-1*  
SC : surface corporelle  
SOCS 3 : *Suppressor of cytokine signaling*  
Th1 : *T helper 1*  
Th2 : *T helper 2*  
TNF $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor alpha*  
VP 1-4 : *Viral protein 1-4*  
VPg : *Viral Protein genome-linked*

# **INTRODUCTION GENERALE**

Les Entérovirus (EV), de la famille des *Picornaviridae*, sont des virus à ARN simple brin de polarité positive. Ils sont divisés en 15 espèces (EV-A à L et les Rhinovirus A à C) qui regroupent actuellement plus de 300 sérotypes <sup>1</sup>. Seuls les espèces d'EV-A, B, C et D et les Rhinovirus A, B et C sont pathogènes pour l'homme. Ce sont des agents infectieux ubiquitaires responsables d'environ un milliard de cas d'infections humaines par an dans le monde <sup>2</sup>. Ces virus sont très résistants dans le milieu extérieur et se transmettent de manière directe par voie fécale-orale ou aérienne mais également de manière indirecte par l'environnement (eau, aliments et matériels inertes souillés). Même si la majorité de ces infections restent asymptomatiques (90% des cas), ces virus sont à l'origine de syndromes infectieux variés dont le pronostic dépend de la dose infectieuse, de l'organe cible, de l'âge, du sexe, de l'origine ethnique et du statut immunitaire de l'individu. Leur grande variabilité génétique est associée à des phénomènes de mutations (substitutions, transpositions et délétions) et de recombinaisons aboutissant à la génération de quasi-espèces virales. Ces mécanismes expliquent la grande diversité génétique et leur pouvoir pathogène très diversifié. Au cours des infections humaines par les EVs, on observe des infections symptomatiques (10% des cas) à l'origine de pathologies bénignes (herpangine, éruptions cutanées, conjonctivites, pharyngites) mais également à l'origine de pathologies sévères nécessitant une hospitalisation (sepsis sévère, myopéricardites, méningites, pneumonies, paralysies, myalgies, infections multiviscérales ante- ou périnatales). Ces infections aiguës pourront être cliniquement plus sévères ou plus longues chez les patients présentant certains déficits immunitaires constitutifs (e.g. agammaglobulinémie, X fragile) ou acquis (e.g. greffés d'organes solides ou de moelle ou stratégies d'immunothérapies) <sup>3</sup>.

Chez le sujet immunocompétent, certaines pathologies aiguës à entérovirus (e.g. myosites, myocardites, paralysies, méningites) peuvent évoluer vers des pathologies chroniques liées à une infection virale de type persistante. Au cours de la phase aiguë de l'infection, la réplication active des EVs permet une large diffusion des virions avec une colonisation du tractus gastro-intestinal et une phase lymphatique suivie d'une virémie. Cette virémie permet aux nouveaux virions de gagner les organes cibles pour s'y répliquer. En réponse à l'infection virale des mécanismes de défense immunitaires précoces de type inné puis spécifiques (humoral et cellulaire) se mettent en place. Au cours de la phase précoce de l'infection aiguë, les EVs sont capables de moduler les

mécanismes de défense des cellules cibles par une diminution de l'expression et de la présentation des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules, l'inhibition de la voie NFκB ainsi que d'autres voies impliquées dans l'activation de la synthèse des interférons de type I<sup>4-8</sup>. La fonctionnalité des cellules dendritiques et de certains lymphocytes T (CD8+ cytotoxique et Natural Killer) est également modulée et ces phénomènes de régulation cellulaire jouent également un rôle important dans l'échappement du virus à la surveillance du système immunitaire inné<sup>7</sup>. Cet échappement au contrôle du système immunitaire serait à l'origine de l'émergence de « variants moléculaires » viraux de persistance issus de mécanismes de délétions génomiques à l'extrémité 5'NC des EVs mais aussi de mécanismes de mutations ponctuelles et/ou de recombinaisons génétiques qui restent à explorer<sup>7</sup>. Les activités de réplication de ces variants viraux de persistance (réplication génomique virale et synthèse protéique) pourraient moduler certaines fonctions des cellules cibles d'organes (fonctions cellulaires spécialisées, balance apoptose/nécrose, réponse inflammatoire, voies de signalisation intracellulaires) et également induire des phénomènes auto-immuns (lymphocytes T et B auto-réactifs, auto-anticorps). Ces mécanismes sont responsables de pathologies humaines chroniques caractérisées par l'absence de virus infectieux détectables en culture cellulaire (absence d'ECP) et par la persistance des ARN génomiques et anti-génomiques viraux et/ou de protéines virales dans les organes cibles. Cette persistance virale est notamment décrite dans des pathologies chroniques comme le syndrome post-poliomyélitique, le diabète de type 1 et la cardiomyopathie dilatée idiopathique<sup>9, 9</sup>.

En 2008, Chapman et al. ont mis en évidence pour la première fois dans les tissus cardiaques d'un patient japonais décédé d'une myocardite fulminante une souche de virus Coxsackie de type B2 (CVB-2) caractérisée par des formes d'ARN génomiques tronquées à l'extrémité 5' de la région non-codante (5'NC)<sup>10</sup>. Ces délétions identifiées entre les nucléotides en position 22 et 36 impactent la structure bi-dimensionnelle du domaine I (feuille de trèfle) de l'ARN génomique qui régulent la réplication génomique virale. Entre 2016 et 2019, notre groupe de recherche (Cardiovir, EA-4684) a identifié pour la première fois par une approche de séquençage haut débit (NGS) que les populations virales persistantes (charge virale faible et ratios ARN(+)/ARN(-)<5) dans les explants cardiaques de patients souffrant d'une cardiomyopathie dilatée (CMD) étaient composées d'une majorité de formes virales tronquées en 5'NC (95%) associée à une proportion minoritaire (< 5%) de formes

virales complètes <sup>11</sup>. La présence de ces formes virales a été associée à la détection des activités de la protéinase virale 2A capable de cliver le facteur de transcription cellulaire eIF4G ainsi que la dystrophine des cardiomyocytes humains <sup>12</sup>. L'ensemble de nos résultats associés à ceux de Chapman et al. suggèrent que les formes virales tronquées pourraient être générées rapidement et sélectionnées dans les tissus cardiaques au cours de la phase de réplication virale aiguë précoce (myocardite aiguë) et que l'émergence de ces populations répliquatives seules ou en association avec des populations virales à ARN complet peut expliquer comment le virus persiste dans les tissus cardiaques permettant à partir de la phase aiguë le développement de la myocardite chronique et de la phase clinique de CMD.

A ce jour la dynamique d'émergence des populations d'EV-B tronquées en région 5'NC et leur impact sur la réponse du système immunitaire inné au cours de la myocardite aiguë reste inconnus. Les délétions génétiques de l'extrémité 5'NC du génome de CVB3 ont des répercussions sur la structure du domaine I (feuille de trèfle) de l'ARN génomique. Ainsi certaines formes tronquées publiées présentent une modification de leurs capacité de fixation des facteurs cellulaires, PCBP (*poly (C)-binding proteins*) et viraux, 3CD (la pré-protéine virale 3CD) sur la structure du domaine I (feuille de trèfle) diminuant ainsi les niveaux de réplication génomique du virus et potentiellement leurs niveaux de détection par le système immunitaire inné <sup>13</sup>. En 2012 et 2016, Van Kuppeveld et al. ont décrit que le récepteur RLR cytoplasmique de type MDA5 reconnaissait préférentiellement l'extrémité 5'NC de l'ARN double brin des EV-B et induisait une réponse IFN de type I *in vitro* de haut niveau dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) sauvage ou KO pour RIG-I <sup>14</sup>. En 2014, Feng et al. ont démontré que la forme tri-phosphorylée de la structure en feuille de trèfle (domaine I) de l'ARN de CVB-3 était suffisante à elle seule pour induire une réponse IFN de type I ainsi que de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par la voie de signalisation RIG-I <sup>15</sup>. Au final, les délétions virales décrites par notre équipe de recherche dans la région 5'NC peuvent modifier les éléments structuraux secondaires de l'ARN des EV-B. Ces éléments structuraux secondaires de l'ARN sont spécifiquement reconnus par les RLRs qui sont des senseurs de l'immunité cellulaire, tel que RIG-I, MDA5 et LGP2. Ainsi, la perte de l'intégrité structurale du domaine I de la région 5'NC modulerait la réponse inflammatoire et la gravité des lésions des tissus cardiaques induites dans la phase de

myocardite aigue, et par conséquence déterminer la sévérité clinique de la myocardite et/ou son évolution vers la phase chronique de la maladie.

Au cours de ce travail de thèse nous avons dans un premier temps, caractérisé au niveau moléculaire les populations d'EV-B tronqués en région 5'NC. Puis nous avons étudié leur impact sur l'activité de réplication génomique et les niveaux de sécrétion d'interféron de type I dans le myocarde et le sang périphérique de patients pédiatriques hospitalisés pour une myocardite à EV-B (banque rétrospective de prélèvements cliniques issus du CHU de Reims et du CNR des Entérovirus). Afin de réaliser cette étude, nous avons développé et validé une méthode standardisée et rapide d'amplification des extrémités d'ADNc (RACE-PCR) suivi d'une micro-électrophorèse capable de détecter et de quantifier les populations virales tronquées ou complètes dans la région 5'NC des EVs humains dans les extraits de tissus cardiaques et de sang périphérique humains. L'impact des formes tronquées sur l'induction de la réponse interféron de type I observé chez les patients a ensuite été validé *in vitro* en cellules immortalisées HeLa229 et en cellules cardiaques primaires humaines.

Dans la deuxième phase de notre travail, nous avons exploré dans un modèle d'infection à CVB3 chez la souris DBA2/J, l'impact de la dynamique d'apparition des formes tronquées en région 5'NC sur la réponse inflammatoire et en particulier la production des interférons de type I dans les tissus cibles. Enfin dans la troisième partie de nos travaux expérimentaux, nous avons déterminé quelles sont les structures nucléotidiques séquentielles ou motifs structurant du domaine I (feuille de trèfle) qui sont responsables de la modulation de l'activation des voies d'IFN de type I dans les cellules cardiaques infectées par CVB3/28. Afin de caractériser le ou les récepteurs de l'immunité innée responsable de leur reconnaissance, nous avons utilisé dans le cadre d'une collaboration avec une équipe de recherche à l'institut Pasteur Paris (Dr Anastasia Komarova), des lignées de cellules STING-37 knock-down (expression des gènes inactivée) pour chacun des récepteurs de l'immunité innée (RIG-I, MDA5 et LGP2)<sup>16</sup>. Ces lignées cellulaires nous ont permis de définir les interactions entre les séquences d'ARN viral dites « immunogènes » et les différents récepteurs impliqués (RIG-I, MDA5, LGP2) dans leur reconnaissance <sup>16</sup>.

Au final, nos investigations cliniques et expérimentales (*in vivo et in vitro*) nous ont permis de mieux comprendre comment les ARN génomiques des EVs complets et tronqués activent les senseurs de l'immunité et la voie des interférons de type I. Les résultats scientifiques à venir pourraient ainsi permettre d'envisager des approches par immunothérapie visant à moduler les réactions inflammatoires délétères dans les myocardites fulminantes ou bien au contraire de favoriser la clairance virale endomyocardique dans les myocardites chroniques ou au stade clinique de cardiomyopathie dilatée (CMD).

**PREMIERE PARTIE :**  
**DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

## I. LES ENTEROVIRUS

---

### A. Introduction

Les entérovirus (EV), ainsi que d'autres espèces de picornavirus, comprennent un grand nombre d'agents pathogènes responsables, dans l'espèce humaine, de manifestations cliniques très diverses, en relation avec un tropisme cellulaire large (système nerveux central, arbre respiratoire, peau, muscle strié et cœur, pancréas, foie, œil, ...). La gravité des infections dues à ces agents est très variable, depuis les formes asymptomatiques ou pauci-symptomatiques (qui représentent environ 90% des cas), jusqu'à des tableaux neurologiques ou cardio-respiratoires d'évolution fatale. Le pronostic dépend de la dose infectieuse, de l'organe cible, de l'âge, du sexe, de l'origine ethnique et du statut immunitaire de l'individu. La capacité de certains picornavirus à induire des infections virales persistantes a conduit à les impliquer dans des pathologies chroniques. Dorénavant, le diagnostic des infections à picornavirus repose presque exclusivement sur des tests d'amplification moléculaire.

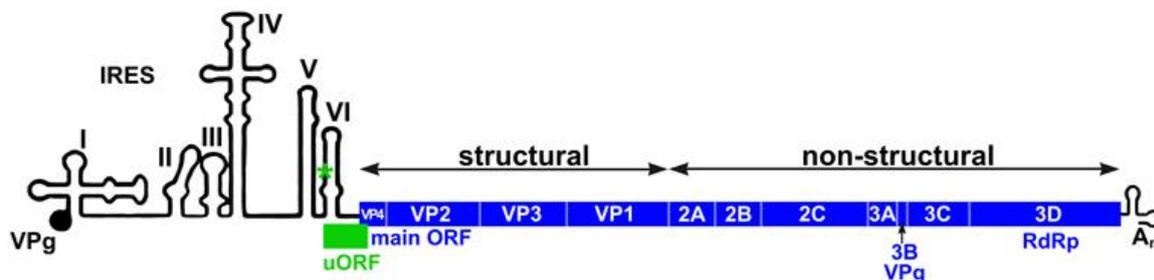
Sous l'angle virologique, les picornavirus pathogènes chez l'homme sont répartis en huit genres au sein de la famille des *Picornaviridae*<sup>17,18</sup> : *Enterovirus* (EV) – incluant les rhinovirus (RV) –, *Parechovirus*, *Hepatovirus* –, *Kobuvirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Salivirus* et *Rosavirus*. Ils présentent une grande diversité génétique et sont responsables de pathologies très variées, à la fois aiguës et chroniques. Leur répartition est ubiquitaire et leur transmission se fait principalement par voie fécale-orale, à partir de réservoirs hydriques, mais aussi par voie respiratoire. Du fait de l'absence d'enveloppe, ils sont très résistants dans le milieu extérieur.

Le genre *Enterovirus* représente le groupe pathogène majeur des picornavirus dans l'espèce humaine. Répartis de façon ubiquitaire, ils sont responsables d'environ un milliard de cas d'infections humaines par an dans le monde<sup>19</sup>. Leur grande diversité ainsi que leur variabilité génétique (mutations, recombinaisons et génération de quasi-espèce virale) expliquent leur pouvoir pathogène très diversifié.

## B. Taxonomie

Le genre *Enterovirus* fait partie de la famille des *Picornaviridae* qui appartient à l'ordre des *Picornavirales*<sup>1</sup>. L'étymologie de « Picorna » dérive de l'association d'une part de « *pico* » signifiant petit en grec ancien et sigle de « Polio, *Insensitive to ether*, Coxsackie et Orphan » et d'autre part « *ARN* » pour Acide deoxyRiboNucléique. Cet ordre inclut les virus qui infectent les cellules eucaryotes et qui partagent ces propriétés communes: (i) ils ont un ARN génomique simple brin de polarité positive coiffée à l'extrémité 5' d'une protéine VPg (Viral Protein genome-linked) liée de façon covalente et avec une queue poly-adénylée en 3', (ii) la traduction de leur génome est réalisé par clivage auto-protéolytique de la polyprotéine virale, (iii) ils ont une capsidie protéique icosaédrique non enveloppée, (iv) ils ont un module de trois domaines contenant une hélicase, une cystéine-protéinase et une ARN polymérase ARN-dépendante<sup>20</sup>.

L'ARN génomique viral possède un premier cadre ouvert de lecture (ou ORF : *Open Reading Frame*) principal qui codent une polyprotéine d'environ 250 kDa. Cette polyprotéine sera maturée en 11 protéines virales structurales et non structurales après clivage autocatalytique par les protéases virales. Récemment en 2019, Lulla et al., ont découvert un second cadre ouvert de lecture en amont de l'ORF principal qu'ils ont nommés uORF (*upstream Open Reading Frame*) (**Figure 1**)<sup>21</sup>. Cet uORF a été identifié chez les Entérovirus A, B et C et semble favoriser le relargage des particules virales lors des étapes tardives du cycle de l'infection dans les cellules épithéliales humaines<sup>21</sup>.



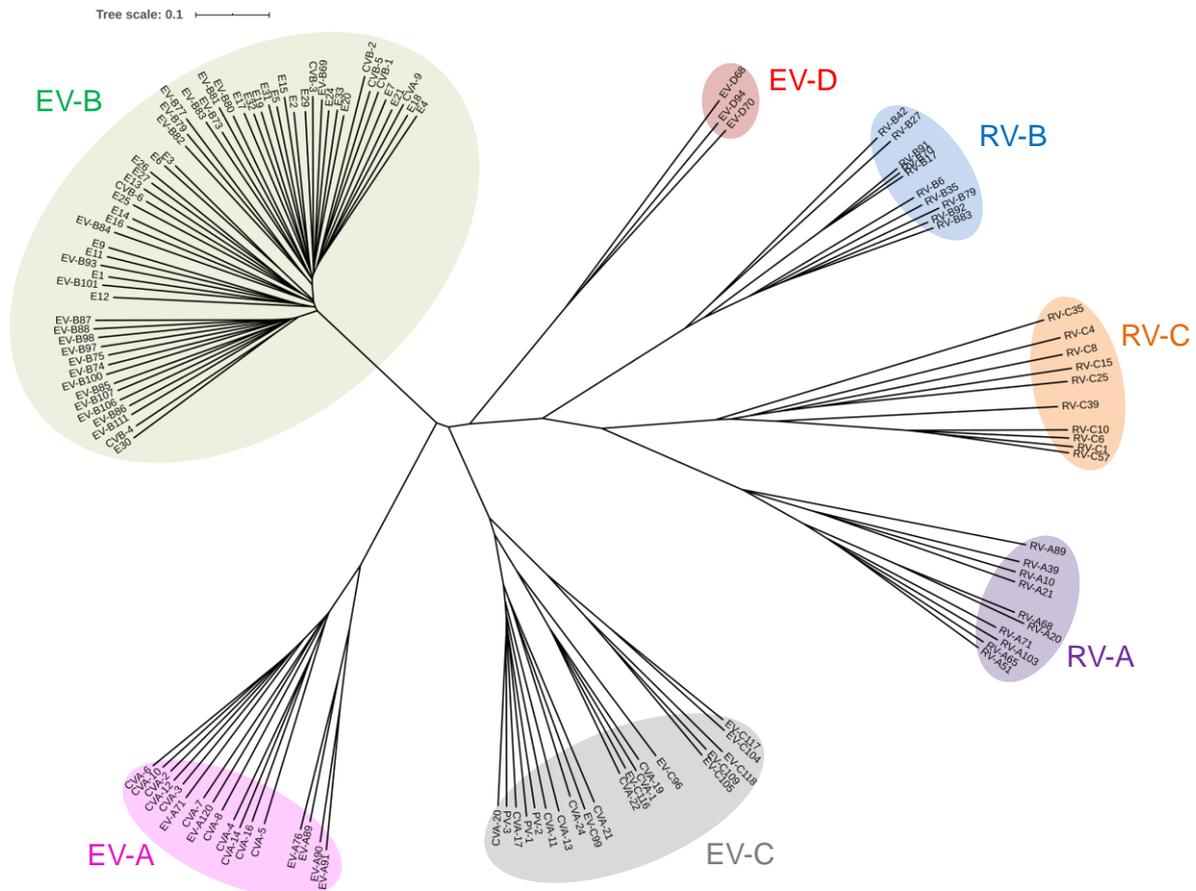
**Figure 1: Représentation schématique du génome des entérovirus présentant 2 ORFs.**

En vert le uORF (*upstream Open Reading Frame*) impliqué dans le relargage du virus lors de l'infection virale en amont de l'ORF principal qui codent la polyprotéine à l'origine des protéines structurales et non structurales. D'après Lulla et al., *Nature Microbiology*, 2019<sup>21</sup>.

Le genre *Enterovirus* (EV) représente le groupe pathogène majeur des picornavirus dans l'espèce humaine. Il est subdivisé en 15 espèces dont 7 sont pathogènes chez l'Homme<sup>22</sup> : les espèces d'entérovirus A, B, C et D et les rhinovirus A, B et C et plus de 300 types (**Figure 2 et Tableau 1**)<sup>17,18</sup>.

Historiquement et sur la base des critères culturels et de sensibilité à différents hôtes, le genre *Enterovirus* était subdivisé en plusieurs sous-genres, dénommés poliovirus, coxsackievirus A (CV-A) et B (CV-B), echovirus (pour « enteric cytopathogenic human orphan virus », E) et EV non classés, chacun comportant plusieurs sérotypes. Depuis la classification internationale des virus de 2013 établie sur des bases phylogénétiques des séquences génomiques ARN, le genre *Enterovirus* regroupe :

- les EV proprement dits, qui comprennent un très grand nombre de types, classés sur des critères moléculaires en quatre espèces appelées enterovirus A, B, C et D ; les PV sont intégrés dans l'espèce EV-C, le PV-1 en étant le chef de file ;
- les RV, qui comprennent plus de 160 types, classés en trois espèces A, B et C. Ces virus utilisent des récepteurs différents<sup>23,24</sup>, ce qui participe à leur classification (**Tableau 1**).



**Figure 2: Analyse moléculaire phylogénétique des espèces d'Enterovirus A à D et de Rhinovirus A à C pathogènes chez l'Homme.**

L'arbre phylogénétique a été synthétisé à partir de la méthode Maximum Likelihood basé sur le génome complet des espèces d'entérovirus (EV A à D) et rhinovirus (RV A à C). EVJ Enterovirus simien J22.

**Tableau 1: Les Entérovirus pathogènes pour l'homme : espèces et sérotypes.**

Espèces	Types
<i>Enterovirus A</i> (EV-A)	25 types: coxsackievirus A2 (CV-A2) à CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, entérovirus A71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89, EV-A90 à EV-A92, EV-A114, EV-A119, EV-A120, EV-A121
<i>Enterovirus B</i> (EV-B)	63 types: CV-B1 à CV-B6, CV-A9, echovirus (E-1) à E-7, E-9, E-11 à E-21, E-24 à E-27, E-29 à E-33, entérovirus B69 (EV-B69), EV-B73 à EV-B75, EV-B77 à EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98; EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107
<i>Enterovirus C</i> (EV-C)	23 types: poliovirus (PV)-1, PV-2; PV-3, coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117 et EV-C118
<i>Enterovirus D</i> (EV-D)	5 types : EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111
<i>Rhinovirus A</i> (RV-A)	80 types: rhinovirus (RV) A1, A2, A7 à A13, A15, A16, A18 à A25, A28 à A34, A36, A38 à A41, A43, A45 à A47, A49 à A51, A53 à A68, A71, A73 à A78, A80 à A82, A85, A88 à A90, A94, A96, A100 à A109
<i>Rhinovirus B</i> (RV-B)	32 types: rhinovirus (RV) B3 à B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B91, B97, B99, B100 à B106
<i>Rhinovirus C</i> (RV-C)	55 types: RV-C1 à RV-C55

Au sein d'une même espèce, il existe un certain nombre de « types » (appelés antérieurement sérotypes) qui peuvent à leur tour comporter des variants regroupés en « génogroupes » (ou génotypes) et « sous-génogroupes » (ou sous-génotypes) en fonction des proximités de séquences <sup>25</sup>. Par exemple, dans l'espèce Enterovirus C du genre Enterovirus, le PV-1 représente un type, lui-même doté d'une grande quantité de variants : souches sauvages, souches vaccinales, souches recombinantes ...

La notion de recombinaisons très fréquentes entre les génomes de souches appartenant à des types ou à des génogroupes différents au sein d'une même espèce a conduit Lukashev <sup>26</sup> à définir une espèce d'entérovirus comme « un ensemble de gènes de capsidite et un essaim de gènes non structuraux et de régions non codantes qui évoluent indépendamment, même en termes de microévolution, et se combinent entre eux de façon libre et fréquente, pouvant conduire à des variants aux propriétés impossibles à prévoir ». Pour qu'une recombinaison ait lieu, il faut que deux virus de la même espèce infectent simultanément la même cellule de manière à pouvoir échanger des parties de génome au cours de la réplication. Les recombinaisons ont lieu préférentiellement entre la région de la capsidite virale, d'une part, et les autres régions du génome viral, d'autre part. Plusieurs recombinaisons successives peuvent avoir lieu. Comme le type est essentiellement défini par les antigènes de la région capsidale, il est courant que deux virus du même type présentent de très grandes divergences au niveau du reste de leur génome. La recombinaison est un élément essentiel au caractère émergent des picornavirus, et des EV en particulier <sup>27,28</sup>. Sous l'angle médical, cette émergence est particulièrement importante pour : l'espèce Enterovirus C du fait de possibles recombinaisons entre PV vaccinaux et PV sauvages, ou bien entre PV et autres types non polio de l'espèce C <sup>29</sup>; l'espèce Enterovirus A du fait de la virulence du type EV-A71 en Asie <sup>30</sup>.

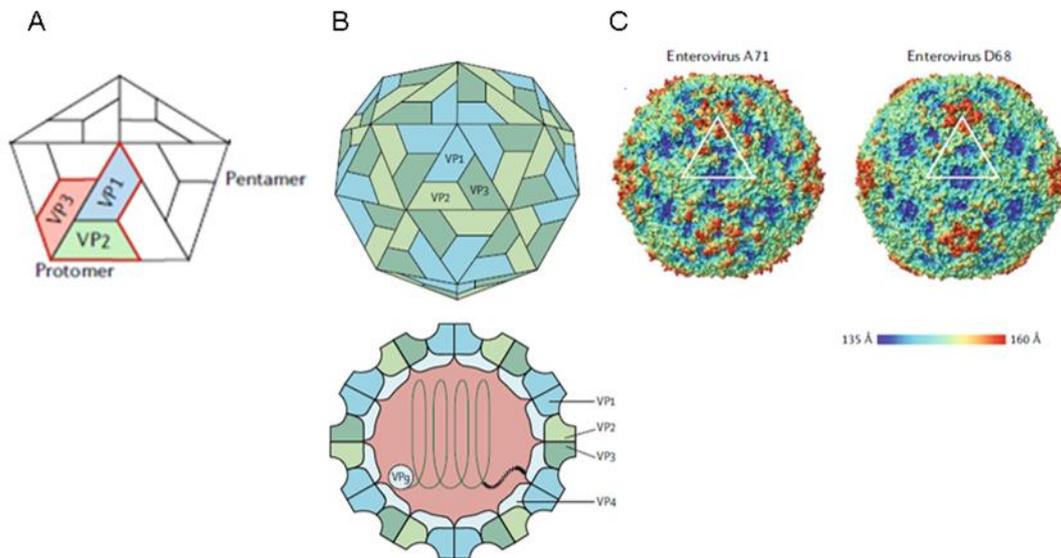
## **C. Structure**

### **1. Structure du virion et propriétés physicochimiques**

Les Picornaviridae sont des petits virus (~30 nm de diamètre) non enveloppés. L'absence d'enveloppe confère à ces virus une grande résistance physicochimique. Ils sont très résistants à l'éther, à l'alcool à 70°, aux détergents neutres et la chloration <sup>31</sup>. Ils conservent leur pouvoir infectieux plusieurs années à -80°C, quelques semaines à 4°C et quelques jours à température ambiante. Cependant, ils sont détruits par les

rayons ultraviolets, les oxydants (hydrochlorite de sodium), le formol et la bêta-propiolactone <sup>20</sup>. L'élément le plus externe du virion est sa capsidie de forme icosaédrique protégeant l'ARN viral (un icosaèdre est un solide composé de 20 faces triangulaires et de 12 sommets).

Cette capsidie est composée de l'assemblage d'une douzaine de pentamères (**Figure 3A**) formées chacun par cinq protomères liés à l'assemblage de chacune des quatre protéines virales structurales : VP (*Viral Protein*) 1 à 4 (**Figure 3A et B**). L'extrémité carboxy-terminale (C-ter) des VP1, VP2 et VP3 est localisée sur la surface de la capsidie virale tandis que l'extrémité amino-terminale (N-ter) se situe à l'intérieur contribuant à la stabilité du virion. La protéine VP4, quant à elle se situe à l'intérieur de la capsidie (**Figure 3B**). Un réseau d'interactions protéines-protéines des protéines VP1 à VP4 permet d'imposer à une douzaine de pentamères une structuration icosaédrique, icosaèdre non parfait puisque siège de surélévations en formes d'étoiles bordées de dépressions appelées canyons (**Figure 3C**) <sup>32,33</sup>. Le canyon est une zone d'importance dans la fonction de la capsidie virale car il permet la fixation du virion à son récepteur grâce à des zones situées dans des poches hydrophobes dont les séquences en acides aminés sont hyperconservées. Les berges du canyon possèdent elles des structures variables autorisant un échappement à la reconnaissance par les anticorps neutralisants <sup>34</sup>.



### Figure 3 : Organisation de la capsid des Entérovirus.

A. Représentation schématique d'un pentamère composé de 5 protomères liés à l'assemblage de chacune des quatre protéines virales structurales de surface VP1, VP2 et VP3 ainsi que de la protéine interne VP4. B. Représentation schématique d'une particule entérovirale dont la capsid est composée d'une soixantaine de protomères. En haut, vue externe, en bas section d'une particule virale. C. Surface capsidique de deux Enterovirus dont la surface est colorée en fonction de la distance par rapport au centre du virion. Le canyon correspond à la zone en dépression (plus proche du centre du virion) ici marquée en bleu<sup>32,33</sup>.

La figure 3C montre que chaque EV (*Picornaviridae*) a sa propre morphologie, du fait de séquences en acides aminés propres inhérentes à la capacité de mutation et de recombinaison des EVs. Il est intéressant de noter que, bien que les sous-unités VP1, VP2 et VP3 n'aient pas d'homologie de séquence, ces trois protéines virales possèdent une même topologie. Les principales différences structurales de VP1, VP2 et VP3 résident dans le coude de connexion des feuillettes- $\beta$  et les séquences en acides aminés des extrémités amino- et carboxy-terminales.

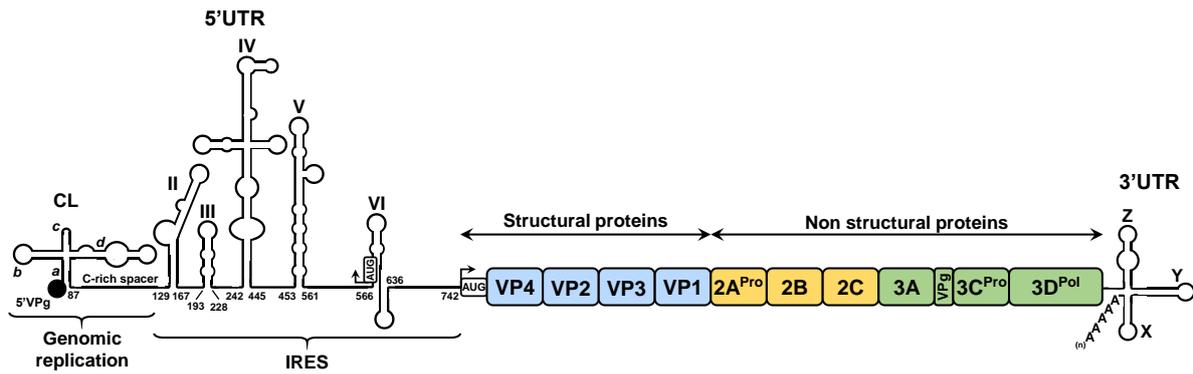
Cette variabilité structurale relative parmi les Entérovirus va avoir des répercussions sur leur stabilité physicochimique et leur transmissibilité. Ainsi, dans le genre Enterovirus, les Rhinovirus transmis par voie respiratoire sont sensibles à un pH inférieur à 6 alors que les autres EVs transmis par voie oro-fécale sont plus résistants dans l'environnement et le tube digestif car encore stables à un pH inférieur à 3<sup>35</sup>.

Cette variabilité structurale parmi les Enterovirus va également avoir des conséquences en termes de capacité antigénique. Ces capacités antigéniques définissent le sérotype viral et elles sont liées sur le plan moléculaire aux extrémités carboxy-terminales des protéines VP1, VP2 et VP3 ainsi que par les différentes boucles connectant les protéines de la capsid à la surface extérieure du

virion. Les tests d'identification sérotypique réalisés par séroneutralisation sur culture cellulaire sérotypage et qui servaient à classer les différents EVs selon leurs capacités antigéniques ont été remplacés par une classification moléculaire des EVs basée selon l'organisation de l'ensemble de leur génome ARN (**Figure 3**).

## 2. Structure de l'ARN génomique

Les Entérovirus possèdent un génome ARN de polarité positive directement traduisible par les ribosomes cellulaires lors de l'entrée dans la cellule, c'est-à-dire qu'il permet la synthèse de protéines virales nécessaire à sa propre réplication. Sa longueur moyenne est de 7500 nucléotides. Le génome des entérovirus contient un premier cadre de lecture principal grâce auquel l'ARN viral codant est traduit sous forme de polyprotéine, maturée secondairement en protéines virales fonctionnelles. Le génome des entérovirus possède une région codante flanquée de la région 5'NC et de la région 3'NC. Cette polyprotéine est autocatalytique car elle sera auto-clivée par ces propres protéinases en 11 protéines virales. La nomenclature actuelle divise la région codante de l'ARN viral en 3 régions P1, P2 et P3 (**Figure 4**). La région génomique P1 code pour des protéines virales structurales VP1 à VP4 impliquées dans la composition de la capsid virale tandis que les régions P2 et P3 codent pour des protéines impliquées dans la maturation et le clivage de la polyprotéine (la protéases 2A et 3C et la protéine 3CD) ou dans la réplication du génome viral (les protéines 2B, 2C, 3AB, VPg, 3CD et la polymérase 3D)<sup>36</sup>.



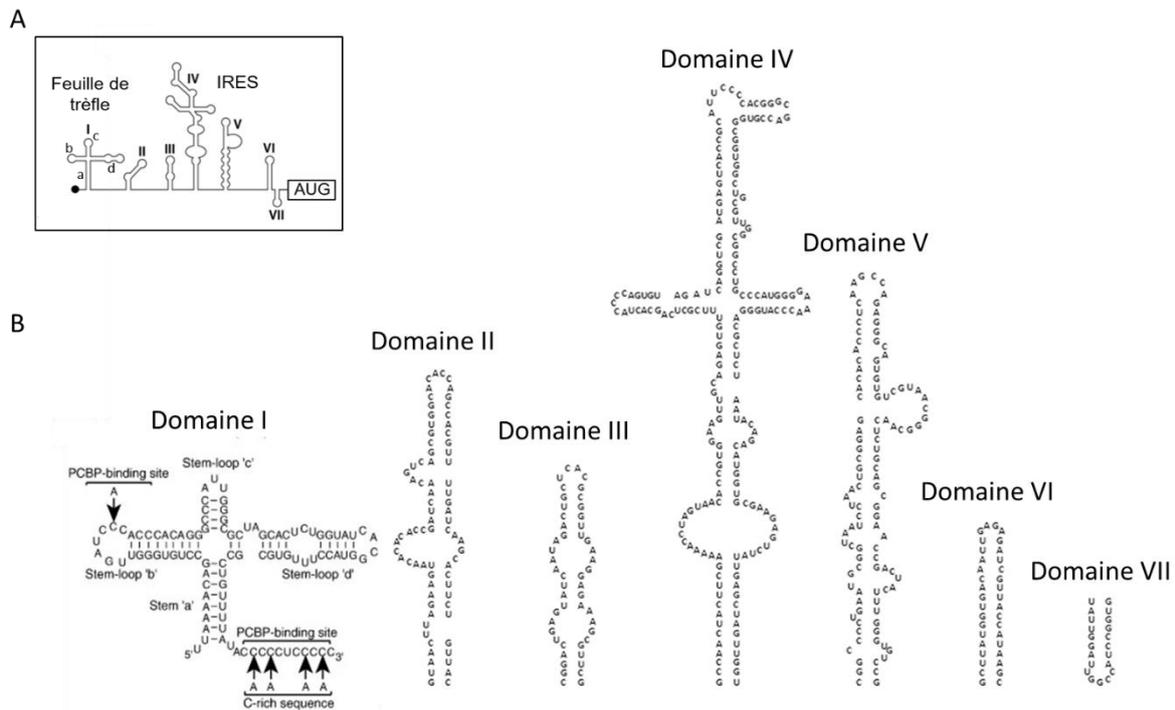
**Figure 4: Organisation schématique de l'ARN génomique des Entérovirus.**

Organisation de l'ARN génomique viral en régions P1, P2 et P3 codant respectivement pour les protéines VP1 à VP4, P2A à P2C et P3A à P3D. La région codante est entourée de 2 régions non-codantes en 5' et 3' impliquées dans la régulation de la réplique et de la traduction. Cette région codante code des protéines structurales (4 protéines de capsides de VP1 à VP4) et des protéines non-structurales (protéases et polymérase virales). 5'NC : région 5'non-codante ; 3'NC : région 3'non-codante ; VPg, *Viral Protein genome linked* ; IRES, *Internal Ribosome Entry Site* ; AAAA queue polyadénylée.

Comme pour l'ensemble l'ensemble des *Picornaviridae*, le génome des EV possède une liaison covalente O<sup>4'</sup>-(5'-uridylyl)-tyrosine entre la région 5'non codante et la tyrosine en 3<sup>e</sup> position de la protéine VPg (*Viral Protein genome linked*, notée également *Protein 3B* au niveau du gène viral ; Figure 4) <sup>37,38</sup>. La VPg varie en taille de 19 à 26 acides aminés et elle n'est pas observée sur les ARNm (ARN messagers) viraux associés aux ribosomes cellulaires qui sont en cours de traduction <sup>39</sup>. Les ARNm viraux diffèrent seulement des ARN viraux par l'absence d'une liaison de la VPg à l'extrémité 5'NC. Cette protéine VPg est une protéine d'importance dans la réplique virale, en servant notamment d'amorce lors de la synthèse des ARN viraux et des brins d'ARN complémentaires non codants appelés ARN de polarité négative <sup>40,41</sup>.

La région 5'non codante (5'NC) est un segment génomique hautement conservé parmi les EVs. Sa longueur varie de 624 à 1199 nucléotides. Cette région du génome est caractérisée par 7 structures secondaires (I à VII) en tige-boucle (*stem-loop*) consécutives aux repliements de l'ARN et permettant le contrôle de la transcription, réplique et de la traduction virale <sup>42</sup>. On retrouve tout d'abord la première structure (I) en feuille de trèfle (CL, *cloverleaf*) composée d'une tige « a » et 3 tige-boucles nommées « b », « c » et « d ». Les six structures suivantes (II à VII) composent le site d'initiation interne de la traduction (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*) (Figure 5) <sup>43,44</sup>.

Le domaine *IRES* est une structure impliquée dans la fixation de ribosomes cellulaires et de ce fait dans la traduction directe de l'ARN génomique viral de polarité positive <sup>42</sup>. L'importance fonctionnelle de cette région 5'NC explique la présence de séquences nucléotidiques hautement conservées parmi les EVs. Des mutations nucléotidiques mineures entre les structures V et VI peuvent avoir un impact probable sur le tropisme cellulaire et le pouvoir pathogène des EV <sup>45</sup>.

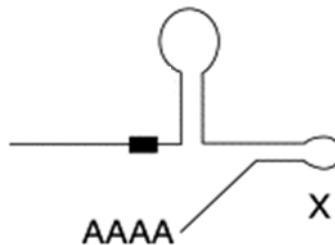


**Figure 5: Organisation des tiges-boucles de la région 5' non codante des entérovirus.**

Les 7 structures en tige-boucle de la région 5'NC sont notées de I à VII. A. La région 5'NC des entérovirus (EV) se compose d'une première structure I en feuille de trèfle composée d'une tige a et de 3 tiges-boucles b, c et d constituant le site d'initiation de la réplication génomique. Les domaines II à VII constituent la région de l'*Internal Ribosome Entry Site* (IRES) nécessaires à la traduction. La position du codon AUG constitue l'initiation de la région codante : la polyprotéine virale. B. Schématisation au sein du domaine I des sites de liaison de la PCBP sur la tige-boucle b et la queue en aval de la tige-boucle d, séquence riche en Cytosine (C).

La région 3' non codante (3'NC) est une zone structurée de courte taille, allant de 47 à 125 nucléotides. La région 3'NC est composée de 2 tiges-boucles en « épingle à cheveux » impliquées dans la synthèse des ARN viraux (**Figure 6**) <sup>46</sup>. Cette région se termine par une queue polyadénylée (Poly(A)) d'une longueur de 35 à 100 nucléotides sur les ARN viraux de polarité positive. Cette queue polyadénylée est transcrite en Poly(U) lors de la synthèse des brins de polarité négative. Lors de la réplication,

l'extrémité de la région 3'NC établit deux interactions ARN-ARN distinctes avec la région 5'NC, une avec la structure en feuille de trèfle et une avec l'IRES <sup>47</sup>. La polyadénylation de la région 3'NC semble essentielle pour maintenir la réplication des EV <sup>48</sup>.



**Figure 6: Représentation schématique de la région 3'non-codante.**

Organisation de la région 3'NC avec 2 tiges boucles X et Y en amont de la queue polyadénylée. Adaptée de <sup>46</sup>

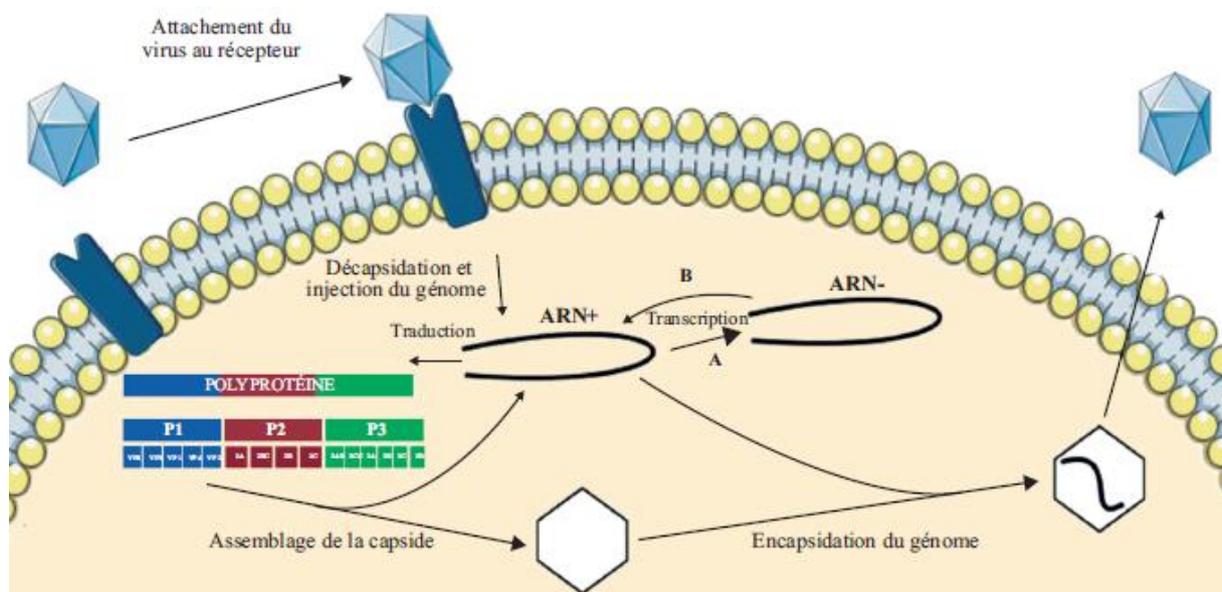
Enfin, des structures *Cis-active RNA elements* (*CRE* ou *ORI I*) existent sur différentes régions du génome viral en tant qu'éléments *cis* régulateur de la réplication du génome viral <sup>49</sup>. Ce sont des éléments d'environ 61 nucléotides qui forment une structure ARN secondaire en tête d'épingle « *hairpin* » au sein de la région P2. Ils permettent la liaison covalente de la VPg et l'initiation de la transcription après fixation de l'ARN polymérase ARN-dépendante (3D polymérase) par uridylation sur la VPg <sup>40,48</sup>.

## D. CYCLE DE REPLICATION VIRALE

La réplication des Entérovirus survient dans le cytoplasme de la cellule hôte après l'attachement du virus à un récepteur cellulaire. L'ARN génomique viral est alors libéré dans le cytoplasme de la cellule après décapsidation. L'ARN viral de polarité positive est alors directement traduit dans le cytoplasme et permet la synthèse de protéines nécessaires à sa propre réplication génomique et à la production de nouveaux virions.

Après traduction de protéines virales, la première étape de la réplication génomique virale consiste en la transcription de l'ARN de polarité positive par 3D polymérase (3D<sup>pol</sup>) en un ARN de polarité négative (aussi appelé « anti-génomique » ou intermédiaire de réplication et non traductible) qui servira de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN viraux de polarité positive pouvant être traduits à leur tour.

Lorsque la traduction permet d'obtenir des protéines structurales en quantité suffisante, l'encapsidation de l'ARN viral survient. Le précurseur des protéines structurales P1 est clivé en protéines de capsidite et s'assemblent en protomères immatures : VP1-VP3-VP0, qui, après clivage de VP0 en VP4 et VP2, s'assemblent en pentamères. Les ARN viraux de polarité positive s'associent aux pentamères pour former des virions infectieux. Le temps nécessaire pour compléter une réplication virale varie entre 5 et 10h (6 à 8h en moyenne) en fonction de la température, du pH et du type cellulaire. La sortie des virions d'entérovirus de la cellule hôte se produit généralement par la perte de l'intégrité de l'hôte ou par lyse cellulaire. Le cycle de réplication viral des EV est illustré au sein de la **figure 7**.



**Figure 7: Cycle de réplication génomique des Entérovirus.**

L'entérovirus pénètre dans le cytoplasme de la cellule permissive après fixation sur son récepteur membranaire et décapsidation. L'ARN positif est alors traduit par les ribosomes cellulaires permettant la synthèse d'une polyprotéine qui est secondairement clivée par des protéases virales endogènes en protéines structurales et non-structurales. A. S'en suit à l'aide de facteurs cellulaires, la transcription de brins d'ARN de polarité négative ne permettant pas la traduction de protéines virales. B. Le brin d'ARN néosynthétisé de polarité négative sert ensuite de brin matrice pour la synthèse d'autres brins d'ARN de polarité positive. L'assemblage de la capsidite à partir des protéines structurales autour de l'ARN positif permet la synthèse d'un virion infectieux après libération par lyse cellulaire <sup>27</sup>.

## 1. Attachement sur le récepteur

L'infection par un EV commence par l'attachement de ce dernier sur une cellule permissive possédant le récepteur nécessaire à l'entrée de l'EV dans la cellule. Il s'agit d'une liaison protéine-protéine entre le canyon de la capsidite de l'EV et le récepteur

membranaire présent à la surface de la cellule hôte. Un seul récepteur membranaire est requis pour certains EV (e.g. poliovirus et les rhinovirus) alors qu'un corécepteur est parfois requis pour d'autres EV. Les différents récepteurs d'entrée d'entérovirus dans la cellule hôte sont listés dans le **tableau 2**. La présence de ces différents récepteurs sur la membrane explique le caractère permissif de la cellule à l'infection et le tropisme des EV pour certains tissus.

**Tableau 2: Récepteurs cellulaires de certains EV.**

Espèce	Virus	Récepteur	Corécepteur	Mode d'entrée	Réf.
EV-A	CV-A9	Intégrines $\alpha$ V- $\beta$ 3 et $\alpha$ V- $\beta$ 6	Intégrines	Endocytose clathrine/cavéoline indépendante	
	CV-A16 EV-71	SCARB2, PSGL1	Acide sialique	Endocytose clathrine dépendante Endocytose cavéoline dépendante	22,23
EV-B	CV-B1 à 6	CAR	CD55 Intégrines $\alpha$ V- $\beta$ 6	Endocytose cavéoline dépendante	24-26
EV-C	PV-1 à 3	PV-R (CD155)		Endocytose clathrine/cavéoline indépendante	27
EV-D	EV-D70	CD55	Acide sialique		28,29
Rhino-A	Rhino groupe majeur	ICAM1		Endocytose clathrine/cavéoline indépendante	30
Rhino-B	Rhino groupe mineur	LDLR et alpha 2MR/LRP		Endocytose clathrine dépendante	31

EV Enterovirus, Rhino Rhinovirus, CV Coxsackievirus, SCARB2 Scavenger Receptor Class B Member 2, PSGL1 P selectin Glycoprotein Ligand 1, CAR Coxsackie Adenovirus Receptor, CD 55 = DAF (decay accelerating factor), PV Poliovirus, ICAM1 Intercellular Adhesion Molecule 1 ; LDLR Low density Lipoprotein Receptor, alpha 2MR/LRP alpha 2-macroglobulin receptor/LDLR-related protein.

Il est intéressant de noter que certains récepteurs sont communs à plusieurs virus, comme le récepteur CAR commun aux Coxsackievirus (CV) et aux Adenovirus, tout comme il est intéressant de noter qu'en fonction des EVs, différents mécanismes d'endocytose sont utilisés (clathrine dépendante, cavéoline dépendante ou non) <sup>50</sup>.

## 2. Traduction de l'ARN viral

Comme il est dépourvu de protéine virale préformée dans sa capsid, l'ARN viral de polarité positive des EVs doit être nécessairement traduit dans le cytosol pour poursuivre son cycle de réplication. Pour ce faire, la protéine VPg liée de manière covalente à son extrémité 5'NC est clivée par des protéases cellulaires<sup>51</sup>. L'ARN génomique est alors traductible comme un ARNm par fixation de l'*Internal Ribosome Entry Site (IRES)* située en 5'NC à la fixation 40S du ribosome cellulaire<sup>42</sup>.

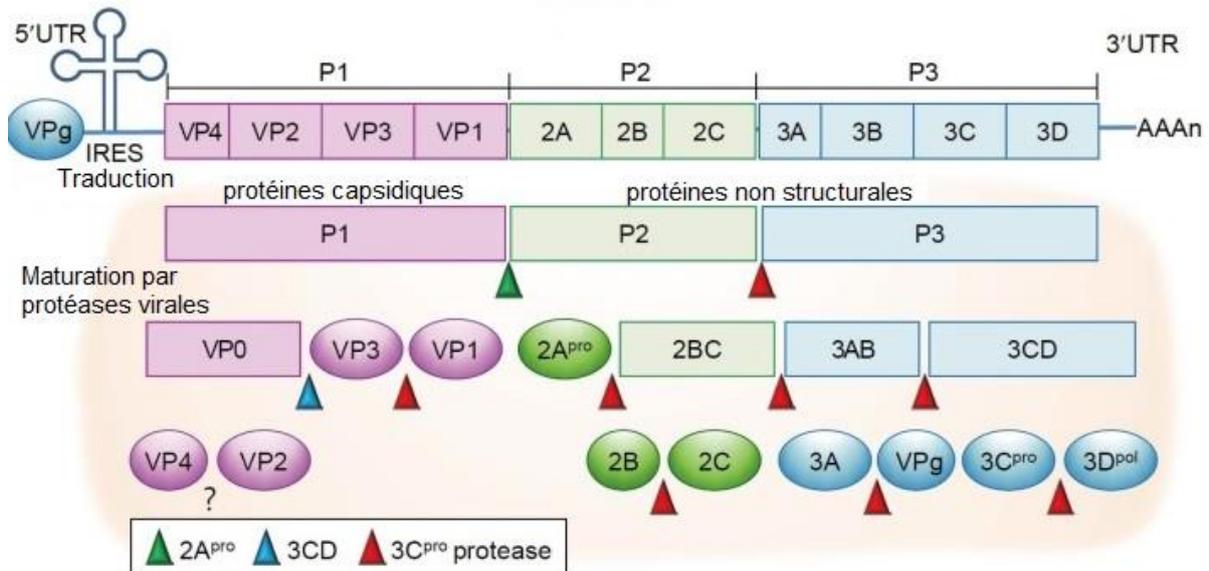
L'initiation de la traduction virale nécessite l'intervention de facteurs cellulaires permettant la stabilisation du complexe traductionnel : les facteurs d'initiation de la traduction *eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$*  (eIF2 $\alpha$ ), eIF3 et eIF4G<sup>52</sup> surtout mais également l'auto-antigène *La* (p52), la *polypyrimidine tract-binding protein* (PTB), les *upstream of N-ras* p97 et p38 (unr) et la *ribosome-associated poly r(C)-binding protein 2* (PCBP2)<sup>53</sup>.

La traduction commence à partir du codon AUG situé en amont de la séquence codant pour la VP4, et la polyprotéine virale est synthétisée d'un seul tenant. Celle-ci est le précurseur de toutes les protéines virales (**Tableau 3**) et elle sera maturée en protéines fonctionnelles par des clivages protéolytiques post-traductionnels. Le premier clivage se réalise par une réaction intramoléculaire (en *cis*) suivie d'une seconde maturation par une réaction intermoléculaire (en *cis* ou en *trans*) Ces différents mécanismes de clivage sont réalisés par les protéases virales : 2A, le précurseur 3CD ou la protéase 3C (**Figure 8**).

**Tableau 3: Propriétés et fonctions des protéines virales des Enterovirus.**

Protéine	Propriétés Domaines	Fonctions	Réf.
VP4	70 AA / 7,3kDa	Protéine de la capsid virale, localisé entièrement à l'intérieur de la surface interne de la capsid.	12
VP2	256 AA / 28,6kDa	Protéine de la capsid virale	12
VP3	231 AA / 25,1kDa	Protéine de la capsid virale,	12
VP1	277 AA / 30,5kDa	Protéine de la capsid virale, interagit avec les récepteurs cellulaires du virus.	12
2A	143 AA / 16,9kDa Site de fixation à eIF4E	Protéase virale. Permet la maturation de la polyprotéine virale. Impliquée dans l'inhibition de la traduction des ARN messagers cellulaires par clivage de facteurs d'initiation de la traduction. Indispensable à la réplication de l'ARN génomique viral	36
2B	151 AA / 17kDa	Localisation au niveau de l'appareil de Golgi. Impliquée dans les modifications de perméabilité de la membrane cellulaire nécessaire à la libération de virions	37
2C	325 AA / 36,5kDa Domaine ATPase Domaine Hélicase putatif	Activité ATPase. Impliquée dans l'encapsidation mais également le relargage des virions, en association avec la protéine 2B. Se fixe à la région 3'NC.	38,39
3A	88 AA / 9,9kDa Protéine transmembranaire	Impliquée dans l'inhibition de la traduction des ARN messagers cellulaires en perturbant le trafic entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi	40
3B (VPg)	20 AA / 2,3kDa	Liée de manière covalente à l'extrémité 5'NC de l'ARN génomique viral. Sert d'amorce à la réplication de l'ARN viral.	15
3C	205 AA / 21,6kDa Cystéine Protéase	Protéase virale, Permet la maturation de la polyprotéine virale.	11 <sup>29-32</sup>
3D	460 AA / 51,9kDa ARN polymérase	ARN polymérase ARN dépendante permettant la réplication des ARN viraux de polarité positive et négative.	41

AA acides aminés, kDa kiloDalton



**Figure 8: Clivages protéolytiques post-traductionnels permettant la maturation de la polyprotéine entérovirale.**

La polyprotéine virale, qui est issue de la traduction de l'ARN génomique viral par les ribosomes cellulaires, est maturée par réactions de clivage auto-catalytique dues à la protéase 2A ( $2A^{pro}$ ), la protéase 3C ( $3C^{pro}$ ) ou leur précurseur ( $3CD$ )<sup>37</sup>.

La poly protéine virale, qui est issue de la traduction de l'ARN génomique viral par les ribosomes cellulaires, est maturée par réactions de clivage auto-catalytique dues à la protéase 2A ( $2A^{pro}$ ), la protéase 3C ( $3C^{pro}$ ) ou leur précurseur ( $3CD$ )<sup>58</sup>. La poly protéine virale est directement clivée dès que les séquences codant les protéases virales sont traduites comme en atteste le fait qu'il n'a jamais été possible d'observer la poly protéine non maturée dans un modèle *in vitro* de cellules infectées. Il est intéressant de noter que le clivage qui survient dans la région P1 entre la VP4 et VP2 n'est réalisé uniquement que lors de l'encapsidation de l'ARN génomique viral<sup>59</sup>. Par contre, dès que les protéases 2A et 3C virales sont libérées de la poly protéine, on peut observer une inhibition de la traduction des protéines cellulaires notamment par le clivage de facteurs d'initiation de la traduction tels que eIF4A1, PABP et eIF4G<sup>35</sup>.

### 3. Réplication de l'ARN viral

La réplication du génome viral a lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte, au niveau de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique qui sont complètement désorganisés durant l'infection à EV. Les protéines virales et notamment la protéine

2C interagissant avec le facteur cellulaire *reticulon 3* y conduisent à la formation de vésicules cytoplasmiques à double membranes <sup>60</sup>, où sera activement répliqué le génome viral, du fait d'un environnement favorable au recrutement de facteurs cellulaires nécessaires à la réplication génomique virale.

L'enzyme virale nécessaire à la réplication est la 3D polymérase (3D<sup>pol</sup>), qui est une l'ARN-polymérase ARN-dépendante. Il s'agit d'une protéine de 52kDa qui ressemble au niveau structural à une main droite avec des domaines paume (site catalytique) et des domaines pouce et de doigts en opposition, encerclant le site catalytique. Il est important de noter que la 3D<sup>pol</sup> est une polymérase de basse fidélité comme toutes les polymérases des virus à ARN<sup>58</sup> à l'origine de mutations aléatoires lors de la réplication des brins d'ARN. La 3D<sup>pol</sup> requiert des facteurs cellulaires *poly(C)-binding proteins* (PCBP) et *poly(A)-binding proteins* (PABP) pour former un complexe de réplication de l'ARN (**Tableau 4**).

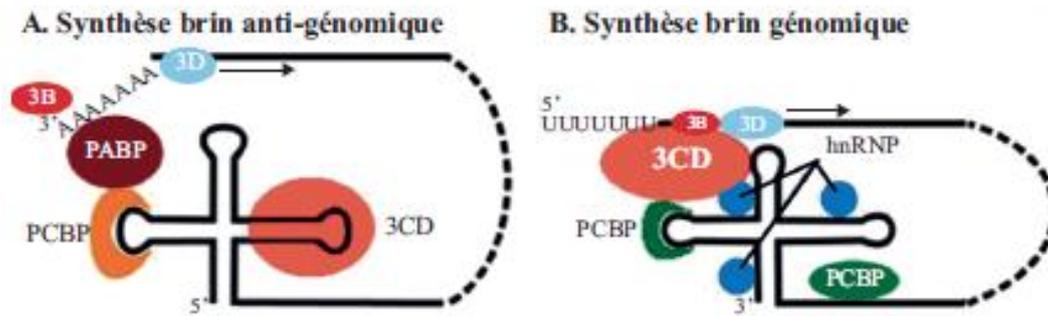
Les PCBP cellulaires se fixent sur la boucle *b* de la structure en feuille de trèfle de la région 5'NC des EV. La fixation des PABP aux PCBP par interaction protéine-protéine, permet ensuite le repliement de l'ARN viral du fait de la fixation de la queue Poly(A) à l'extrémité de la région 3' NC aux PABP. Cette boucle ainsi formée stabilisant la structure tertiaire du complexe de réplication permet l'interaction de la protéine virale précurseur 3CD avec la boucle *d* de la structure en feuille de trèfle <sup>61,62</sup> (**Figure 9A**). Ainsi, la 3D<sup>pol</sup> peut exercer son activité d'ARN-polymérase ARN-dépendante en utilisant la protéine VPg comme amorce et synthétiser le brin d'ARN de polarité négative. De façon intéressante, il n'a jamais été détecté de forme libre simple brin d'ARN anti génomique dans une cellule infectée, ce brin servant de matrice à la synthèse d'autres ARN de polarité positive.

La transcription des ARNs anti génomiques en ARN de polarité positive est semblable à la transcription des ARNs génomiques. De façon similaire, il est nécessaire d'observer un repliement de l'ARN viral. Ce repliement est dû à l'interaction de facteurs cellulaires tels que les PCBP à la structure secondaire en feuille de trèfle présente à l'extrémité de la région 3'NC de l'ARN de polarité négative (**Figure 9B**). La synthèse des ARN viraux est asymétrique, la production des brins d'ARN génomique est de 30 à 70 fois plus forte que la synthèse des ARNs antigénomiques <sup>35</sup>.

**Tableau 4: Facteurs cellulaires et viraux impliqués dans la réplication génomique des Entérovirus**

Protéines cibles	Séquence d'interaction	Protéines d'interaction	Fonction	Références	
<b>PCBP 1</b>	Poly(rC) Binding Protein 1	Domaine-I tige-boucle "b" (cloverleaf) & réduit l'affinité du domaine-IV (IRES)	Protéines virales 3C <sup>pro</sup> & 3CD <sup>pro</sup>	Initiation de la traduction virale et de la synthèse d'ARN	(Gamarnik and Andino, 1997; Murray et al., 2001; Walter et al., 2002)
<b>PCBP 2</b>	Poly(rC) Binding Protein 2	Domaine-I tige-boucle "b", Région riche en Carbone (C) & Domaine-IV (IRES)	SRp20, dimerisation de PCBP2, protéines virales 2A <sup>pro</sup> , 3C <sup>pro</sup> & 3CD <sup>pro</sup>	Initiation de la traduction virale et de la synthèse d'ARN. Passage de la traduction virale à la réplication virale génomique	(Bedard et al., 2007; Gamarnik and Andino, 1997; Murray et al., 2001; Parsley et al., 1997; Perera et al., 2007; Sean et al., 2008; Spear et al., 2008; Toyoda et al., 2007; Zell et al., 2008a, 2008b)
<b>EF-1<math>\alpha</math></b>	Eukaryotic elongation factor 1 $\alpha$	Domaine- I (cloverleaf)	Protéine virale 3CD <sup>pro</sup>	Candidat cofacteur de la réplication du génome entéroviral	(Harris et al., 1994)
<b>La</b>	Lupus autoantigen	Réduit l'affinité du domaine-I, IRES & 3'UTR	Dimerisation de La	Le complexe 5'UTR-La / La-3'UTR peut former une boucle de réplication et améliorer l'initiation de la réplication virale. Cofacteur du complexe protéine-ARN d'initiation de la pré-traduction	(Cheung et al., 2002, 2007)
<b>hnRNP K</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Domaines-I à II & Domaine-IV (IRES) & 5'UTR biotinylé des EV71	Domaine KH2, le domaine riche en proline et un domaine voisin de KH (KH1 or KH3)	Inhibition de la synthèses d'ARN viral	(Li et al., 2016; Lin et al., 2008, Shih et al, 2011)
<b>hnRNP A1 &amp; A2</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and A2	Domaines-II à II & Domaine-VI (IRES)	-	Activation de l'IRES / régulation de l'épissage alternatif, et antagonise l'activité des protéines de la famille riches en sérine-arginine (SR)	(Levengood et al., 2013; Li et al., 2016; Lin et al., 2009)
<b>hnRNP C</b>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	Extrémité 3' des brins négatifs & domaine-I	Protéines virales P2 and P3 & 3D <sup>pol</sup> , 3CD <sup>pro</sup>	Améliore la synthèse d'ARN viral	(Dreyfuss et al., 1993; Roehl and semler 1995, Brunner et al., 2005)

Protéines cibles	Séquence d'interaction	Protéines d'interaction	Fonction	Références	
<b>PABP</b>	Poly(A) binding protein	Domaine-I tige-boucle "b" (cloverleaf)	PCBP2, 3C <sup>pro</sup> & 3CD <sup>pro</sup>	Améliore la traduction médiée par l'IRES et la synthèse d'ARN	(Barton et al., 2001; Herold and Andino, 2001; Svitkin et al., 2007)
<b>3AB</b>	Protein 3AB	Domaine-I tige-boucle "b" (cloverleaf)	Protéines virales 3C & 3CD en absence d'ARN	Améliore la traduction médiée par l'IRES et la synthèse d'ARN	(Molla et al., 1994)
<b>3CD<sup>pro</sup></b>	Proteinase 3CD	Domaine-I tige-boucle "d" (cloverleaf)	PABP, PCBP2	La fixation sur la feuille de trèfle entraîne une répression de la traduction virale et une amélioration de la synthèse d'ARN à brin négatif	(Andino et al., 1990; Claridge et al., 2009; Du et al., 2004; Headey et al., 2007; Ohlenschläger et al., 2004; Pathak et al., 2007; Prostova et al., 2017; Rieder et al., 2003; Sharma et al., 2009; Sun et al., 2016; Zell et al., 2002)
<b>3C<sup>pro</sup></b>	Proteinase 3C	Domaine-I tige-boucle "b" ou "d" (cloverleaf)	PABP, PCBP2	Clivage de protéines cellulaires tel que le facteur d'initiation de la traduction eIF4G et la protéine de liaison poly (A) (PABP) conduisant à l'arrêt de la traduction de l'hôte + clivage de hnRNPA1 conduisant à réduire l'effet inhibiteur de hnRNPA1 sur l'apoptose + Initiations de la traduction virale et de la synthèse d'ARN	(Andino et al., 1990, 1993; Cornell and Semler, 2002; Gamarnik and Andino, 1998, 2000; Parsley et al., 1997; Prostova et al., 2015, 2017; Xiang et al., 1995; Yang et al., 2004; Sun et al., 2016)
<b>FBP2</b>	far-upstream element-binding protein 2	Domaines I à III, le domaine V-VI et la région liaison du 5'UTR des EV71	Far-upstream element (FUSE) en amont du gène c-myc & les motifs KH2 et KH4	Facteur régulateur négatif pour l'IRES et inhibition de la synthèse des protéines virales	(Shih et al, 2011; Lin et al, 2009)
<b>FBP1</b>	far-upstream element-binding protein 1	Uniquement la région de liaison (637 à 745nt) de la région 5'UTR des EV71	Far-upstream element (FUSE) en amont du gène c-myc & les motifs KH3 et KH4	Facteur régulateur positif pour l'IRES et améliore de la synthèse des protéines virales	(Shih et al, 2011; Lin et al, 2009)
<b>2A<sup>pro</sup></b>	Proteinase 2A	-	Clivage de 3CD pour produire 3C' et 3D' + VP1 et P2	Clivage de protéines cellulaires tel que le facteur d'initiation de la traduction eIF4G et la protéine de liaison poly (A) (PABP) conduisant à l'arrêt de la traduction de l'hôte	(Joachims et al, 1999. KrÄusslich et al, 1987; Yang et al., 2010; Mu et al., 2013)



**Figure 9: Synthèse des brins d'ARN anti-génomiques et génomiques.**

A. Repliement et structure tertiaire formée par le complexe de réplication lors de la transcription de l'ARN génomique en ARN antigénomique. B. Repliement et structure tertiaire formée par le complexe de réplication lors de la transcription de l'ARN antigénomique en ARN génomique. PABP : *Poly(A) Binding Protein*, PCBP : *Poly-(C) Binding Protein 1*, 3B = VPg, 3D : Polymérase 3D, hnRNP : *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (dont font partie les PABP et PCBP) (5).

#### 4. Assemblage et libération du virion

La réplication virale permet l'augmentation du nombre de brins d'ARN génomiques permettant la synthèse d'avantage de protéines virales, comme le précurseur protéique P1, qui va être clivé par la protéase virale 3C et son précurseur en protéines VP1, VP3 et VP0 (**Figure 5**). Un premier assemblage intermédiaire immature s'établit par la complexation d'une copie de chacune de ces protéines virales VP0, VP1 et VP3 en un protomère 5S (coefficient de sédimentation). L'assemblage de 5 protomères 5S permet la formation d'un pentamère 14S (**Figure 2A**). L'assemblage à son tour de pentamères 14S permet la formation d'une capsidie vide 80S. L'insertion d'un ARN viral génomique au sein de cette unité 80S permet la formation d'un pro-virion 150S non mature. La dernière étape de la morphogénèse virale implique la maturation des protéines VP0 par clivage en VP4 et VP2, permettant de stabiliser la structure en virion 160S mature plus stable<sup>63</sup>. Aucune protéase à ce jour n'a été identifiée pour expliquer le clivage de VP0 en VP4 et VP2 et un rôle auto catalytique dépendant de l'ARN viral est suspecté. Il est intéressant de noter que le processus d'encapsidation du génome des EVs est hautement spécifique, permettant l'incorporation du seul ARN génomique viral de polarité positive dans la capsidie et non des ARNm viraux, cellulaires ou anti génomiques (ARN négatif (-)).

La VPg présente sur ces ARN génomiques ne peut pas être un peptide signal de l'encapsidation du génome viral car elle se fixe également sur l'ARN viral anti génomique non retrouvé à l'intérieur de virions matures<sup>64</sup>. Une interaction entre la

protéine virale 2C et la VP3 est présumée être impliquée dans ce processus d'encapsidation spécifique <sup>65</sup>.

La libération des virions matures s'accumulant dans le cytoplasme à l'extérieur de la cellule pour pouvoir infecter de nouvelles cellules avoisinantes permissives se fait surtout par lyse de la cellule infectée, mais également par fusion de vacuoles autophagiques avec la membrane cellulaire <sup>32</sup>.

## **E. EVOLUTION ET ADAPTATION GENETIQUE DES ENTEROVIRUS.**

### **1. Mutations/Recombinaisons**

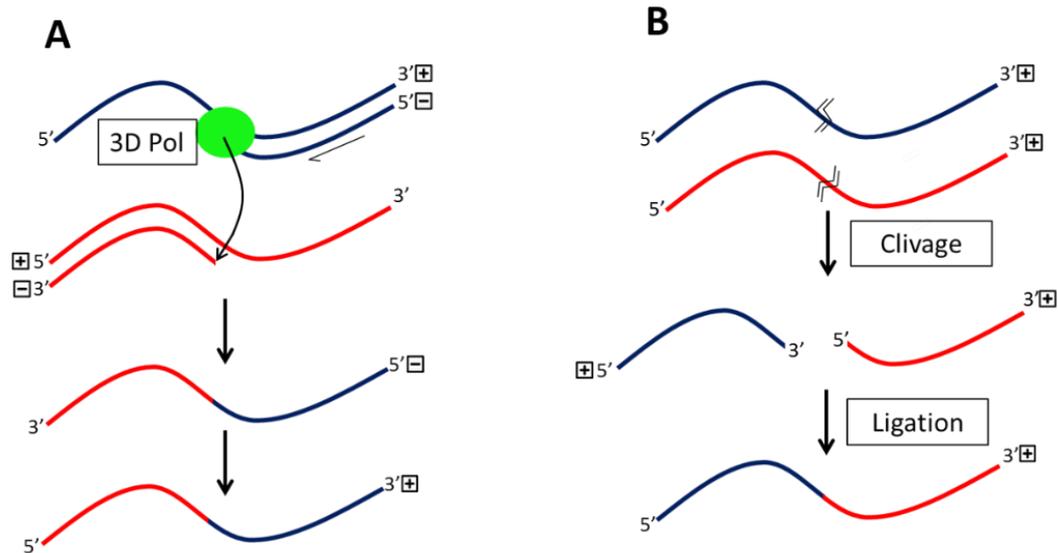
Outre les mutations spontanées générées par la faible fidélité de la 3Dpol à chaque cycle de réplication <sup>58</sup>, des phénomènes de recombinaison contribuent à la genèse d'ARN d'EV de séquences différentes. Les populations d'EV présentent une grande variabilité génétique, à l'origine d'une grande capacité d'adaptation sous pression de sélection notamment dans des environnements complexes. La diversification du génome des EVs peut affecter la virulence, le tropisme tissulaire, les barrières d'espèce inter-hôtes <sup>66</sup> et moduler la persistance virale à l'échelle d'une cellule comme d'une population. La distribution des populations d'EV mutantes avec des séquences génomiques différentes à chaque cycle de réplication correspond au concept de quasi-espèces virales, comme cela a déjà été décrit pour beaucoup d'autres virus à ARN <sup>66</sup>.

Les mutations spontanées sont inhérentes à la basse fidélité de la 3Dpol <sup>58</sup> et concernent surtout les protéines virales de surface de la capsid VP1, VP2 et VP3, exposées à l'environnement où l'on note jusqu'à 25% de variations nucléotidiques, alors que la protéine VP4 plus interne et les protéines non structurales présentent des variations nucléotidiques nettement moindres. Pour ces dernières, cette faible variabilité génomique est liée à l'absence de modification des interactions avec le milieu extérieur en cas de mutation (VP4) et au risque de perte de la fonctionnalité en cas de mutation (protéines non structurales). A l'inverse, une mutation aléatoire sur une protéine virale de la capsid VP1, VP2 et VP3 peut entraîner un changement structural modifiant les capacités infectieuses et donc la dynamique de réplication virale (« fitness » viral). Du fait du modèle d'évolution génétique des EVs basé sur la notion de pression de sélection, une souche d'EV mutante pourrait devenir la

population dominante au sein des quasi-espèces présentes dans l'environnement immédiat et ce, au détriment d'autres souches d'EV avec une « fitness » viral plus faible. Cette diversité génétique inhérente à des mutations est fondamentale pour l'adaptation des EVs. A titre d'exemple, il a été démontré antérieurement que des poliovirus présentant une polymérase de haute-fidélité n'étaient pas capables de générer des mutations adaptatives en culture tissulaire ou d'infecter le système nerveux central de souris comme des souches classiques de poliovirus sauvages <sup>66</sup>.

La recombinaison génétique virale est le second moyen en plus des mutations spontanées, de moduler la diversité génétique des EVs. Il est extrêmement courant chez les *Picornaviridae* bien que différent de celui décrit dans le système eucaryote. Pour les mêmes raisons de pression de sélection et de perte de la fonctionnalité en cas de mutation de protéines non structurales, il touche principalement les protéines non structurales. Deux mécanismes de recombinaison existent de manière non exclusive pour les EVs ; le mécanisme réplicatif (ou le modèle de choix de copie) et le mécanisme non réplicatif (appelé aussi le modèle « breakage-joining ») <sup>67</sup>.

Dans le mécanisme réplicatif, la recombinaison des EV repose sur la translocation de la polymérase 3D d'un brin d'ARN modèle vers un nouveau brin lors de la synthèse des brins négatifs de la réplication génomique, elle sera à l'origine d'un génome chimérique qui contiendra les fragments génomiques des deux brins parentaux (**Figure 10A**). Le modèle réplicatif de recombinaison est le mécanisme privilégié dans la recombinaison des virus à ARN. Dans le mécanisme non réplicatif (**Figure 10B**), de l'ARN viral ou même cellulaire est fragmenté du fait de contraintes physiques, de l'activité d'endoribonucléases cellulaires, de ribozymes, ou par autocatalyse. Ces fragments pourront se lier entre eux par trans-estérification, ou par réparation enzymatique grâce aux ligases cellulaires, en cas d'extrémités compatibles. Il en résulte la formation d'un génome viral chimérique <sup>67</sup>.



**Figure 10: Mécanismes de recombinaison des Enterovirus.**

**A** La recombinaison répliquative correspond à une dissociation du brin d'ARN néosynthétisé au brin matriciel lors de l'étape de réplication génomique de l'ARN viral par la polymérase virale. La polymérase se détache alors du brin matriciel et s'associe à un nouveau brin d'ARN. La synthèse du brin néosynthétisé continue suivant le nouveau brin matriciel induisant la synthèse d'un génome chimérique. **B** La recombinaison non répliquative se produit lors de la fragmentation du génome par des activités enzymatiques ou des dommages physicochimiques. Ces fragments génomiques peuvent être réparés par ligation autocatalytique ou par des ligases cellulaires, qui résultent en un génome chimérique.

Les deux mécanismes présentés dans la figure 10 peuvent générer deux types de recombinaisons, homologues et non homologues, en fonction de la localisation du site de recombinaison. La recombinaison homologue survient sur des sites similaires de la structure secondaire de l'ARN viral pour les deux brins d'EV parentaux. Cette recombinaison produit un génome recombinant possédant l'exakte structure génétique des souches parentales qui ont un haut taux d'homologie de séquence. A l'inverse, la recombinaison non homologue a lieu en des sites et structures différentes chez les deux brins d'EV parentaux qui n'ont pas forcément une haute homologie de séquence. On peut ainsi observer chez les virus recombinants non homologues des délétions, des insertions voire des duplications génomiques <sup>67</sup>.

## 2. Quasi-espèces et dynamique d'évolution des populations virales

La distribution des souches d'EV mutants au sein de cellules, de tissus ou d'organismes infectés correspond aux quasi-espèces <sup>68</sup>, dont le concept a été déjà décrit pour beaucoup de virus à ARN <sup>66</sup>. Cette hétérogénéité des populations virales trouve son origine dans les mutations spontanées dues à l'absence d'activité

correctrice de la polymérase virale à chaque cycle de réplication virale et dans les événements de recombinaison tous deux sous tendus par l'activité de réplication des ARN viraux. Cette multitude de variants ou quasi-espèces virales étroitement liées mais non identiques constitue un réservoir de variations génétiques pouvant être délétères, neutres, ou bénéfiques en fonction de l'environnement dans lequel la population d'EV évolue <sup>66</sup>. Cette multitude de variants ou quasi-espèces virales étroitement liées mais non identiques constitue donc un réservoir en termes d'adaptabilité ou de plasticité des EVs (e.g échapper à une réponse immunitaire innée ou adaptative). Les quasi-espèces interagissent entre elles négativement ou positivement, c'est à dire qu'une quasi-espèce inhibe ou favorise la réplication des autres quasi-espèces, par exemple par compétition ou trans-complémentation respectivement <sup>68</sup>. Ce réservoir en termes d'adaptabilité ou de plasticité est dépendant de la réplication virale et l'évolution des quasi-espèces dans un environnement non évolutif pourrait être mathématiquement prédite. Cependant, des récentes données obtenues par des approches de séquençage de nouvelle génération (NGS) ont démontré que des quasi-espèces minoritaires à fitness faible donc on prédisait mathématiquement la disparition sont encore détectables à très bas niveau <sup>68</sup>.

## II. INFECTIONS HUMAINES A ENTEROVIRUS

---

### A. EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS À ENTEROVIRUS

#### 1. Epidémiologie des infections à Entérovirus dans le monde

Les entérovirus (EVs) sont des agents viraux ubiquitaires qui circulent tout au long de l'année dans les régions tropicales et de façon saisonnières dans les zones tempérées telles que la France et l'Europe. Dans les pays industrialisés ainsi que dans les pays en voie de développement les espèces A à D des EVs se transmettent principalement par voie fécale-orale avec excrétion du virus dans les selles responsable de la contamination des réservoirs hydriques et de l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés <sup>69,70</sup>. Le manuportage à partir de selles infectées représente la voie de contamination majoritaire (famille, crèches, services de néonatalogie). La transmission des EVs peut également se faire par voie respiratoire ou muqueuse (conjonctive, sphère oto-rhino-laryngologique [ORL]) à partir de gouttelettes liquidiennes ou de lésions cutanées infectées <sup>71-73</sup>. Enfin, la transmission transplacentaire des EVs est possible <sup>35</sup>, mais la fréquence de cet évènement est difficile à estimer ; le plus souvent sans conséquences immédiates pour l'embryon ou le fœtus, elle peut être à l'origine d'infections généralisées gravissimes chez le nouveau-né quand elle survient en fin de grossesse (EMC 2020 Pillet et al., *in press*).

L'infection est dans 90% des cas asymptomatique ou pauci symptomatique (affections fébriles non spécifiques). L'évolution est en règle générale bénigne hormis chez le nouveau-né qui peut développer une infection systémique potentiellement fatale (sepsis post natal) et chez les patients avec une immunodépression de type humorale (gammaglobulinémie) ou avec certains traitements immunosuppresseurs. Il est actuellement reconnu que les EVs sont un des principaux genres de virus infectant l'Homme et que jusqu'à 20% des enfants dans les pays développés excrètent des particules virales dans leurs selles <sup>74,75</sup>. Le nombre d'infections symptomatiques à EV est aujourd'hui estimé entre 10 à 15 millions de cas par an aux Etats-Unis <sup>74</sup>.

Les EVs sont des pathogènes ubiquitaires évoluant sur un fond endémique et des poussées épidémiques <sup>75</sup>. Même s'il existe dans les pays industrialisés certains biais de surveillance épidémiologique au profit des infections les plus sévères

nécessitant une hospitalisation ou une consultation aux urgences (méningite aseptique, encéphalite et infection en période néo natale) <sup>74,75</sup>, on note une saisonnalité marquée avec un plus grand nombre d'infections à EV en fin d'été, début d'automne dans les pays à climat tempéré <sup>74</sup>. Les EVs sont détectés surtout chez l'enfant et l'adulte de moins de 20 ans et il existe une discrète prépondérance masculine uniquement chez les moins de 20 ans <sup>74</sup>.

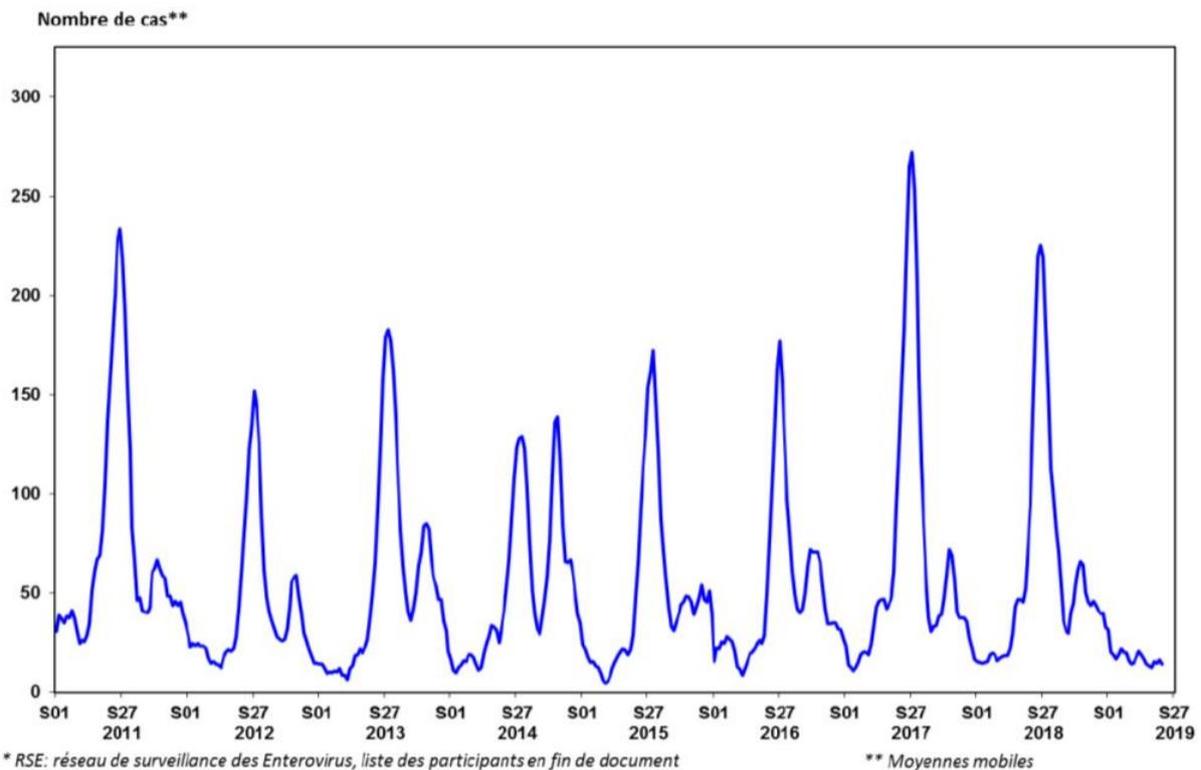
Même si le nombre de séquences disponibles d'EV isolés augmente de manière exponentielle notamment des séquences de la région VP1 les plus communément utilisées pour le séquençage, on ne parvient pas à faire de lien absolu entre un génotype donné et la survenue d'une épidémie, le même génotype étant endémique dans certains pays et épidémiques dans d'autres <sup>75</sup>. Il existe vraisemblablement d'autres facteurs que le génotype viral dans la genèse d'une épidémie, comme le niveau d'hygiène, le climat et l'immunité préexistante dans la population humaine géographiquement exposée <sup>75</sup>.

## 2. Epidémiologie des infections à Entérovirus en France

En France, même si seuls les cas de poliomyélite font l'objet d'une déclaration obligatoire auprès des agences régionales de santé (ARS), les Centres Nationaux de Référence associés des Centres Hospitaliers Universitaires de Lyon et Clermont Ferrand assurent une mission de surveillance des EVs non poliomyélitiques en lien avec l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS) (<https://cnr.chu-clermontferrand.fr/CNR/default.aspx>). Chaque année en France les diagnostics d'infections à EV connaissent un pic estival avec un second pic de moindre ampleur au cours de l'automne principalement liée à la recrudescence des méningites virales (**Figure 11**). La même épidémiologie avec la même prédominance des infections est retrouvée dans les autres pays développées au climat tempéré <sup>76</sup>.

Les Centres Nationaux de Références associés assurent le génotypage des souches isolées et surveillent les EVs émergents pourvoyeurs de tableaux neurologiques sévères tels que les EV-A71 et les EV-D68, régulièrement rencontrés depuis 2014 et 2016 respectivement et dont l'incidence est plus faible en France qu'aux Etats-Unis ou en Asie <sup>74</sup>. On ne retrouve pas non plus de lien absolu entre l'émergence d'un nouveau variant viral et une épidémie, des souches anciennes semblant capables de donner

de nouvelles épidémies <sup>77</sup>. La dynamique exacte de circulation des EVs reste partiellement incomprise du fait des infections asymptomatiques et des zones géographiques ne pouvant assurer de surveillance épidémiologique des génotypes circulants <sup>75</sup>. Le système de surveillance Oscour® de Santé publique France a enregistré en 2019 une augmentation des consultations pour méningites virales avec un pic en avril et un second pic en juin <sup>76</sup>.



**Figure 11: Infections à entérovirus en France du 1er janvier 2011 au 11 juin 2019.** Distribution des cas positifs aux infections à entérovirus par semaine, d'après les données du réseau de surveillance des entérovirus (RSE), en France<sup>76</sup>.

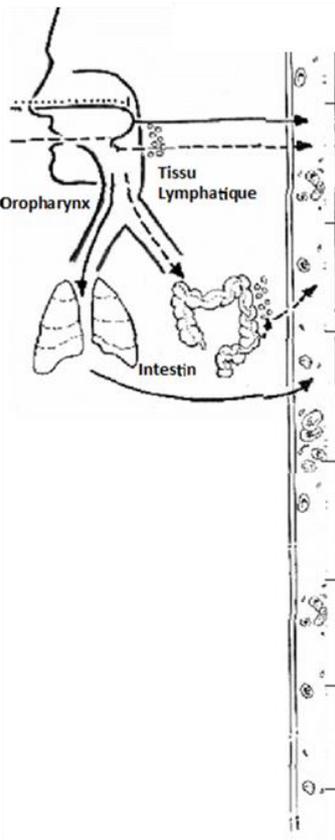
## B. PHYSIOPATHOLOGIE GENERALE DES INFECTIONS À ENTEROVIRUS

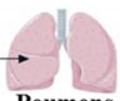
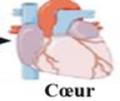
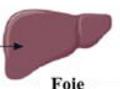
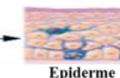
### 1. Pouvoir pathogène chez l'Homme : infections aiguës

Les EVs sont responsables d'un large spectre de pathologies humaines allant de l'infection asymptomatique dans 90% des cas, voire sub-clinique ou infracliniques, jusqu'à des atteintes multi-viscérales mortelles chez le nourrisson ou des infections aiguës fulminantes chez l'adulte <sup>3</sup>. Après pénétration dans l'organisme, les EVs infectent des cellules permissives au niveau de site de réplication primaire que sont

les amygdales mais également les plaques de Peyer et le tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT) que peuvent gagner les EVs du fait de leur résistance au pH acide de l'estomac <sup>35</sup>. S'en suit une phase de virémie brève <sup>78</sup> à partir de ces sites de réplication primaire leur permettant d'atteindre des organes cibles tels que le foie, le pancréas, la peau, les muscles, le système nerveux central (SNC), les poumons ou encore le cœur (**Figure 12**). La réplication des EVs au sein du tissu ou des organes cibles atteints permet le développement d'une deuxième phase de virémie et l'excrétion principalement fécale du virus <sup>9,35</sup>.

Les séquelles et le pronostic sont variables en fonction des types de virus à l'origine de l'infection, de la dose virale infectieuse, de l'organe cible, de l'âge, du sexe, de l'origine ethnique et du statut immunitaire de l'individu <sup>79</sup>. Le tropisme viral et les organes cibles infectés varient en fonction de l'espèce et du type d'EV. Les syndromes cliniques fréquents très évocateurs des EVs sont les méningites aseptiques et le syndrome pied-main-bouche. Il n'y existe pas de spécificité d'un type d'infection aiguë à un génotype viral. Les rhinites, bronchites, bronchiolites, pneumonies sont dues aux virus Coxsackie de type A, B (CV-A et CV-B), Echovirus, rhinovirus, EV-D68, EV-A71 et EV-A104. Les infections des muscles striés squelettiques avec myosite sont dues aux EV du groupe B alors que les infections cardiaques sont principalement dues aux CV-A, CV-B et les Echovirus, classés respectivement dans les espèces d'EV-A, EV-B ou C <sup>75</sup>. Les infections cutanéomuqueuses comme le syndrome pied-main-bouche, ou l'exanthème de Boston, l'Herpangine et la conjonctivite hémorragique sont dues aux CV-A et CV-B, aux Echovirus et à l'EV-A71. Enfin, les atteintes pancréatiques sont dues aux CV-B et Echovirus alors que les atteintes neuro-méningées (méningite aseptique, encéphalite, paralysie flasque, poliomyélite ou tableau « polio-like ») sont dues aux CV-A, CV-B, Echovirus, poliovirus, EV-D68 et EV-A71 (**Figure 12**).



Organes cibles	Pathologies Aiguës	Pathologies chroniques
 <b>Poumons</b>	<b>Rhinite, bronchite, bronchiolite, pneumonie, pneumopathie</b> CV-A, CV-B, Echovirus, EV-68 EV-71, EV-104	-
 <b>Pancréas</b>	<b>Pancréatite</b> CV-B, Echovirus	<b>Diabète Insulino-dépendant</b> CV-B, Echovirus
 <b>Cœur</b>	<b>Péricardite, myocardite aiguë</b> CV-A, CV-B, Echovirus	<b>Myocardite chronique, CMD</b> CV-B
 <b>Foie</b>	<b>Hépatite</b> CV-B, Echovirus	-
 <b>SNC</b>	<b>Méningite, Poliomyélite</b> Poliovirus, CV-A, Echovirus	<b>Syndrôme Post-Poliomyélique</b> Poliovirus
 <b>Muscles squelettiques striés</b>	<b>Myopathie</b> CV-A, Echovirus	-
 <b>Epiderme</b>	<b>Syndrôme Pied Main Bouche</b> CV-A, CV-B, EV-71	-

**Figure 12: Pathologies humaines dues aux Entérovirus.** CV Coxsackie Virus, EV Enterovirus <sup>10</sup>.

## 2. Pouvoir pathogène chez l'Homme : infections chroniques ou persistantes

Après la phase aiguë de l'infection, les EVs peuvent persister dans l'organisme et engendrer des lésions chroniques tissulaires qui sont responsables de pathologies chroniques cliniquement observables. Les virus persistants présentent des activités de réplication génomique avec des charges virales ARN génomiques ou totales (ARN positifs et négatifs) de niveaux modérés et qui sont associées à la production de protéines virales structurales et non structurales ainsi que de particules virales (non infectieuses et non détectables par les techniques classiques de culture virale) ; ces structures virales ou particulières vont impacter sur le fonctionnement de la cellule infectée mais aussi entretenir différents mécanismes d'inflammation chronique et d'auto-immunité. Trois tableaux chroniques sont actuellement imputables à une infection persistante par des EVs humains : le diabète insulino-dépendant « dit de type 1 » après une pancréatite due aux EVs, le syndrome post-poliomyélique caractérisé par des symptômes neuromusculaires survenant 30 à 40 ans après une paralysie

poliomyéлитique<sup>80</sup> ; et les pathologies cardiaques à type de myocardites chroniques et de cardiomyopathies dilatées (CMD). Le rôle des EV a également été évoqué mais non formellement démontré dans d'autres maladies humaines d'étiologies indéterminées comme la sclérose latérale amyotrophique (SLA), le syndrome de fatigue chronique ou plus récemment la maladie coeliaque<sup>81-83</sup>.

## C. MYOCARDITE AIGUE

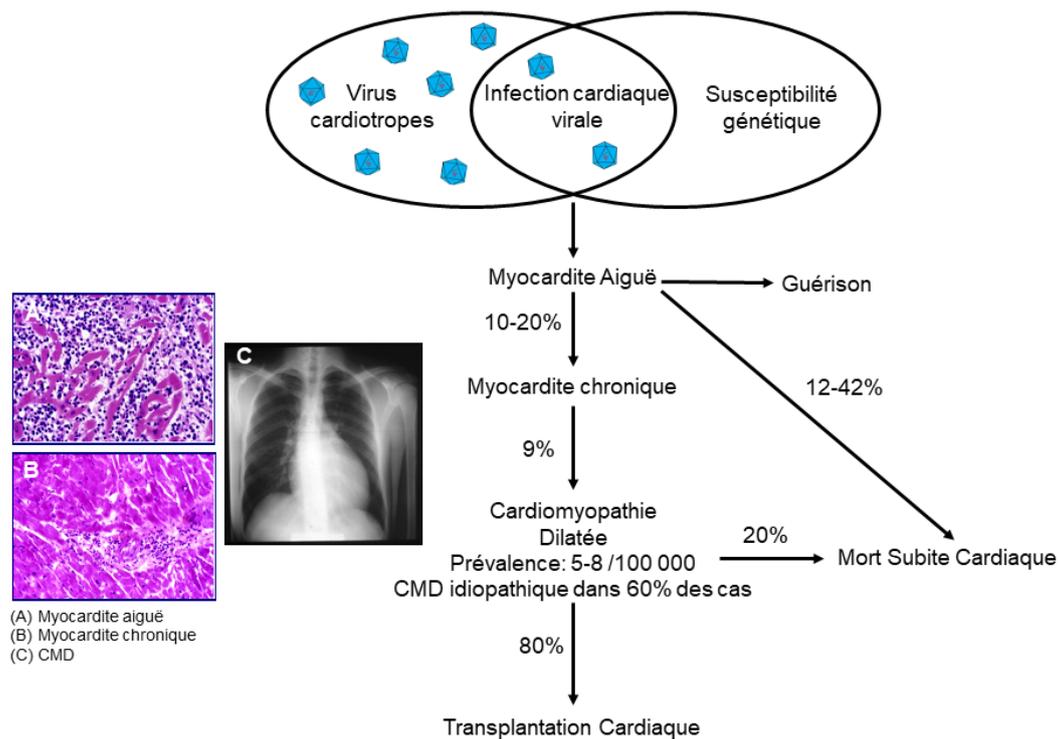
### 1. Définition

Le terme « myocardite » prononcé pour la première fois par Corvisart au XIXe siècle<sup>84</sup> caractérise une inflammation du myocarde qu'elle soit d'origine infectieuse, auto-immune, toxique, liée à une hyper éosinophilie ou dans le cadre d'une réaction d'hypersensibilité médicamenteuse<sup>85</sup>. Les causes virales restent dans les pays développés la principale étiologie de cette affection au tableau clinique polymorphe<sup>85</sup>. Les principaux agents viraux pourvoyeurs de myocardite en Europe et aux Etats-Unis sont les EVs et plus spécifiquement les virus Coxsackie (CV) du groupe B, le Parvovirus B19 (PVB19), le virus Human Herpes Virus 6 (HHV-6) et les Adénovirus. Ces 4 espèces virales sont plus fréquentes<sup>86</sup> que les autres espèces virales plus rarement en cause dans les myocardites : *Herpes simplex virus* 1 et 2, Myxovirus et Paramyxovirus dont le virus respiratoire syncytial (VRS), les virus influenza et parainfluenza, l'Epstein Barr virus (EBV) ou le cytomégalovirus (CMV), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le VHC, le virus de l'encéphalomyocardite murine<sup>84,85</sup> et les virus émergents (Encéphalite Japonaise, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, Filoviridae, virus Nipah et Hendra).

### 2. Symptômes cliniques et évolution

Les symptômes cliniques de la myocardite aigue sont variés avec des formes asymptomatiques ou pauci symptomatiques. Cliniquement, les myocardites se manifestent généralement par un tableau pseudo-grippal non spécifique (fièvre, arthromyalgies) avant la survenue de symptômes plus évocateurs de l'atteinte myocardique (douleur thoracique pseudo-angineuse, dyspnée, palpitations). L'électrocardiogramme (ECG) peut être modifié avec des troubles de la repolarisation non concordante avec un territoire coronaire et non associés à des anomalies angio-

coronarographiques significatives. Il peut exister des variations du taux d'enzymes musculaires spécifiques ou non du myocarde telles que la créatinine phosphokinase, la myoglobine, ou la troponine cardiaque <sup>84</sup>. Le tableau clinique de la myocardite virale peut se résoudre spontanément, (**Figure 13**) : (i) soit dans le cadre d'une guérison spontanée avec clairance virale ; (ii) soit dans le cadre d'un passage à la chronicité avec évolution progressive vers une myocardite chronique (10 à 20% des cas), et le stade clinique de cardiomyopathie dilatée (CMD) (9% des cas) <sup>87</sup> et l'apparition insidieuse ultérieure de signes cliniques d'insuffisance cardiaque congestive. L'évolution du tableau de myocardite peut être rapidement associé à : (i) une mort subite cardiaque (12 à 42% des cas de myocardite aiguë et 20% des cas de CMD) sur troubles du rythme ventriculaire liés à l'effet bathmotrope positif de l'inflammation myocardique; (ii) un tableau de défaillance cardiaque/choc cardiogénique nécessitant un support hémodynamique (on parle alors de myocardite fulminante) liée à l'effet délétère sur la fonction ventriculaire cardiaque <sup>88</sup> du Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ), cytokine de la réponse immunitaire de profil T helper 1 (Th1). Dans le cadre du stade final clinique de CMD caractérisée par une défaillance cardiaque biventriculaire, une transplantation de cœur est réalisée dans 80% des cas ; c'est à l'heure actuelle la première cause de transplantation cardiaque dans le monde <sup>89</sup>. Du fait de la variabilité profonde de la sévérité du tableau clinique de myocardite, l'échocardiographie ou l'Holter ECG peuvent être normaux tout comme ils peuvent retrouver des anomalies aspécifiques non univoques du diagnostic <sup>85</sup>. Un épanchement péricardique peut être associé et on parle alors de myopéricardite.



**Figure 13: Evolution des infections cardiaques humaines à entérovirus.**

A. Coloration à l'Hématoxyline Phloxine Safran (HPS) d'un tissu cardiaque d'un patient atteint de myocardite virale aiguë. B. Coloration HPS d'un tissu cardiaque d'un patient atteint de myocardite chronique. C. Radiographie thoracique d'un patient de sexe masculin âgé de 23 ans hospitalisé en S.I. cardiologie au stade clinique terminal de CMD présentant une dilatation bi-ventriculaire<sup>10</sup>.

### 3. Diagnostic positif d'une myocardite aiguë et examens complémentaires

Le diagnostic positif de myocardite reposait jusque dans les années 1990 uniquement sur l'histologie conventionnelle et les critères de Dallas<sup>90</sup> à partir des prélèvements cardiaques autopsiques, sur explants en cas de greffe cardiaque ou à partir des biopsies endomyocardiques (BEM). Brièvement, le diagnostic de myocardite aiguë était affirmé en présence d'un infiltrat inflammatoire et de nécrose cardiomyocytaire alors que le diagnostic de myocardite « borderline » était affirmé en présence d'un infiltrat inflammatoire sans dégât cardiomyocytaire<sup>90</sup>. L'histologie conventionnelle a l'intérêt d'être potentiellement corrélée à des scénarii cliniques plus ou moins aigus<sup>85</sup> mais sa sensibilité limitée a été critiquée<sup>91</sup>. Elle est désormais associée à des marqueurs immunohistochimiques CD3, CD68 et HLA-DR<sup>92</sup> qui font désormais partie des critères diagnostiques de myocardite<sup>93</sup>. C'est désormais l'imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque qui est l'examen de référence pour le diagnostic positif

des myocardites présumées non éligibles à une biopsie endomyocardique <sup>94</sup>. La corrélation entre l'IRM et la biopsie endomyocardique semble meilleure en cas de myocardite aiguë évoluant depuis moins de 14 jours, avec dans cette situation une sensibilité et une spécificité respectives de 80 et 70% <sup>95</sup>.

Aujourd'hui la recherche de virus chez les patients souffrant de myocardite repose sur la détection moléculaire du matériel génomique des virus au sein des tissus cardiaques <sup>86</sup>. Il est intéressant de noter que les 3 agents viraux les plus fréquemment retrouvés au sein des prélèvements cardiaques de sujets souffrant de myocardites étaient les Adenovirus, les EV et le Cytomegalovirus dans 23, 14 et 3% <sup>96</sup> alors que les agents viraux les plus fréquemment retrouvés au sein des prélèvements cardiaques de sujets souffrant de CMD étaient le PVB19, HHV-6 et les EV seuls ou en association dans 51, 26 et 9% des cas <sup>86</sup>, respectivement. La détection moléculaire doit être quantitative pour accréditer l'implication de certains virus dans la myocardite comme par exemple le PVB19 en cas de charge virale supérieure à 500 cp/μg par rapport à une détection aspécifique de PVB19 sans lien avec la pathologie en cas de charge virale inférieure <sup>97</sup>. Par ailleurs, les anticorps anti-cellules cardiaques sur sang périphérique (e.g anti-myosine...) ont été développés pour confirmer que la myocardite est de nature immunologique <sup>85,94</sup>.

#### **D. CARDIOMYOPATHIE DILATEE**

Les cardiomyopathies sont la principale cause de mort subite et d'insuffisance cardiaque terminale nécessitant un recours à la transplantation cardiaque dans les pays développés. La cardiomyopathie dilatée (CMD) est la forme la plus fréquente avec une incidence d'1 cas sur 250 à 500 personnes <sup>98</sup>. Même si la classification des cardiomyopathies ne cesse d'évoluer <sup>87,98</sup>, les définitions basées sur la morphologie cardiaque proposées initialement en 1980 restent aujourd'hui communément utilisées <sup>98</sup>. La CMD est définie comme une cardiopathie avec dysfonction systolique, baisse de la Fraction d'éjection du Ventricule Gauche (FEVG) et élargissement des cavités cardiaques sans élargissement de la paroi ventriculaire <sup>87</sup>.

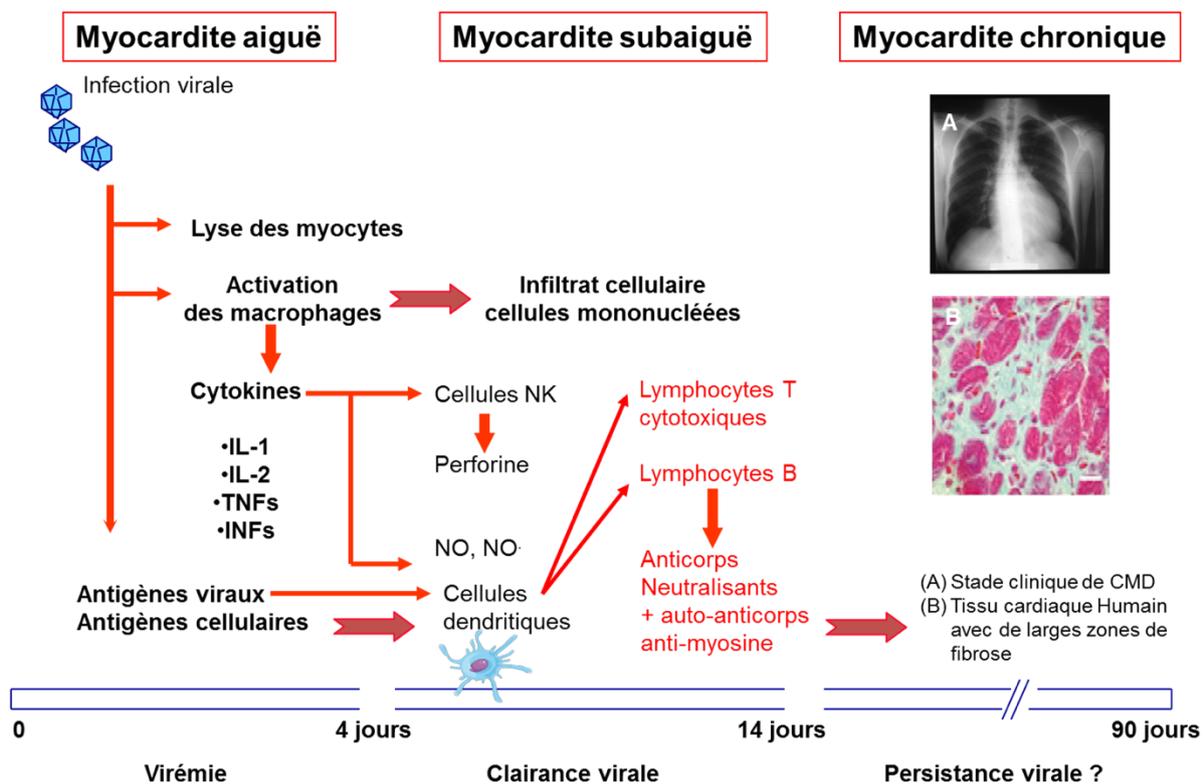
## Classification et étiologies des cardiomyopathies dilatées (CMD)

La cardiomyopathie est dite primaire lorsque la maladie à une expression cardiaque directe et elle est dite secondaire lorsqu'elle intervient dans le cadre d'une affection systémique <sup>87</sup>. Parmi les cardiomyopathies primaires, les CMD sont classées comme mixtes, soit innées soit acquises, avec une plus grande proportion de forme acquise <sup>87</sup>. Les étiologies pourvoyeuses de CMD acquise <sup>87</sup> sont très nombreuses (nutritionnelles, ischémiques, endocriniennes, toxiques, inflammatoires, auto-immunes, de surcharge...). Même si l'on tend à rapprocher les CMD de pathologies du cytosquelette cardiomyocytaire altérant la transmission de la force de contraction <sup>98</sup>, le cadre nosologique des CMD reste toujours utilisé en pratique.

Ainsi, devant une CMD répondant à de nombreuses étiologies possibles, outre le traitement symptomatique de l'insuffisance cardiaque <sup>98,99</sup>, une enquête étiologique complémentaire doit être menée, même si l'on ne retrouve pas d'étiologie dans 50% des cas <sup>100</sup>, car confirmer une étiologie accessible à un traitement spécifique étiologique ouvrirait la possibilité d'enrayer l'évolution spontanément défavorable des CMD (i.e 50 % de survie à 5 ans) <sup>100</sup>. Il en est de même désormais pour la recherche d'une myocardite car il est désormais universellement admis qu'une myocardite peut évoluer parfois défavorablement vers le phénotype de CMD <sup>85</sup>. Ce concept repose sur la présence d'un antécédent de myocardite dans 10% des cas de CMD <sup>101</sup> et sur des données expérimentales où l'inoculation d'EV par voie intrapéritonéale chez la souris peut reproduire des lésions histologiques de myocardite aiguë puis ensuite celles observées lors des CMD <sup>85</sup>. Mettre en évidence une myocardite associée d'origine virale ou immunologique dans le cas d'une CMD peut permettre d'envisager la mise en route de traitement spécifique<sup>84</sup> (**Figure 14**) avec parfois un bénéfice sur la survie <sup>102</sup>. Le cadre nosologique des myocardites et des CMD se confondant, on parle désormais de cardiomyopathie inflammatoire en cas de myocardite avec dysfonction cardiaque <sup>93</sup>. Ce cadre de cardiomyopathie inflammatoire permet de limiter les investigations étiologiques d'une CMD à celles pourvoyeuses également de myocardite <sup>103</sup>. La détection des génomes viraux au sein des tissus cardiaques de patients souffrant de CMD varie en fonction des séries publiées et on retient une prévalence moyenne de 30% <sup>86,104,105</sup>.

## E. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MYOCARDITE AIGUE À ENTEROVIRUS JUSQU' À LA CARDIOMYOPATHIE DILATÉE

La compréhension des différentes phases immunologiques de la myocardite virale a été obtenue dans des modèles murins de myocardite induite par les EVs humains et plus particulièrement de myocardite à CV-B<sup>84,85</sup>. L'infection cardiaque se développe en trois phases immuno-pathologiques distinctes définies comme, phase aiguë, subaiguë et chronique (**Figure 14**). L'inoculation intra-péritonéale d'EV et notamment de CV-B chez la souris conduit au développement d'une myocardite aiguë qui, en l'absence de décès de l'animal, dure 14 jours avant que l'on ne puisse plus détecter à partir des prélèvements cardiaques de l'animal, de particules virales par la recherche d'effet cytopathogène (ECP) sur culture cellulaire. Cette absence de détection par culture correspond soit à une clairance virale avec absence de détection de CV-B par PCR soit à une persistance virale avec PCR positive même si la culture virale ne montre plus d'ECP<sup>106,107</sup>. En cas de persistance virale, des dégâts histologiques cardiaques similaires à ceux observés dans les myocardites chroniques et les CMD sont observés chez la souris<sup>108</sup>. Ces données expérimentales chez la souris valident le concept du passage possible mais non systématique chez l'Homme d'une myocardite aiguë au stade de myocardite chronique puis de CMD<sup>85</sup>. L'issue d'une infection à EV dépend tant de la souche virale en cause que de l'immunité de l'hôte infecté. En effet, la capacité des souris à réaliser une clairance virale dépend de l'inoculum et de la souche virale en cause<sup>107</sup> mais également du fond génétique de la souris (clairance virale fortement diminuée en cas d'immunodépression)<sup>106,107</sup>.



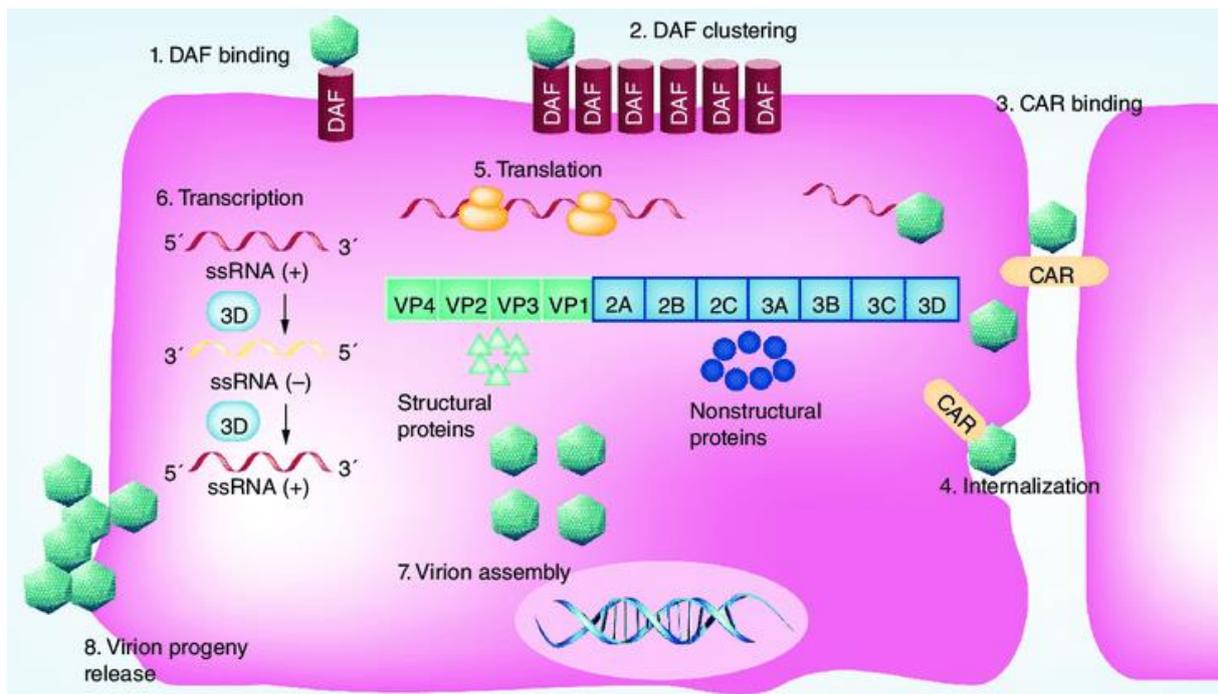
**Figure 14: Mécanismes immuno-pathologiques développés au cours de la myocardite à entérovirus et son évolution vers la myocardite chronique et le stade clinique de cardiomyopathie dilatée (CMD).**

(A) Stade clinique de CMD ; (B) Tissu cardiaque humain avec de larges zones de fibrose (trichrome de Masson)<sup>10</sup>.

### 1. Phase de myocardite aiguë

Après contamination par voie fécale-orale ou respiratoire et une première phase de réplication au sein de l'épithélium respiratoire, digestif ou des amygdales, une phase virémique peut entraîner la diffusion jusqu'au myocarde et la survenue d'une myocardite aiguë chez certains sujets prédisposés. En effet, bien que 90 % des individus soient infectés par un ou des agents viraux communs à tropisme cardiaque comme les EVs au cours de leur vie, seulement une minorité d'entre eux développera une myocardite associée à des signes cliniques<sup>85</sup>. Il existe des susceptibilités immunologiques de l'hôte favorisant la survenue de myocardite qu'elles soient acquises (carence en sélénium ou maladie de Keshan) ou innées (polymorphisme haplotype HLA-DQ ou CD45 modifiant la réaction immune antivirale<sup>109</sup>, densité en récepteurs ou corécepteurs viraux, mutation de protéines de l'hôte cibles potentielles de protéases viraux).

Au cours de la phase de virémie primaire, les EVs cardiotropes circulant dans le flux sanguin peuvent interagir avec différents récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales leur permettant de franchir la barrière vasculaire endomyocardique et d'être transportés dans les espaces intercellulaires des cardiomyocytes. Les cellules cardiaques expriment à leur surface des récepteurs communs aux adénovirus capables de fixer les protéines de capsides des EVs : CAR (Coxsackie Adenovirus receptor). Ce récepteur appartenant à la superfamille des immunoglobulines est exprimé à la jonction serrée des cardiomyocytes. Son accessibilité y est favorisée dans les cas de myocardite et l'expression de CAR est augmentée dans les cas de CMD <sup>110</sup>. L'autre corécepteur préférentiel des EVs est le récepteur DAF (Decay Accelerating Factor), inhibiteur de la convertase de la fraction C3 du complément (C3 convertase) (**Figure 15**).



**Figure 15: Entrée du virus Coxsackie B3 dans la cellule cible et cycle de réplication génomique.**

CAR : Coxsackievirus and adenovirus receptor ; DAF : Decay Accelerating Factor ; VP1 à 4 : viral protein 1 to 4. D'après <sup>111</sup>

Les niveaux d'expression de ces récepteurs modulent la diffusion des agents viraux (CV-3, HHV-6 et PVB-19), et constituent des cibles antivirales potentielles <sup>86,109</sup>. Après pénétration dans le cardiomyocyte, l'ARN génomique va être directement traduit en polyprotéine virale qui va être auto-clivée en protéines fonctionnelles via les protéases

virales. Les protéases virales vont entraîner le clivage de nombreuses protéines cellulaires telles que les protéines du cytosquelette (dont la dystrophine), des facteurs d'initiation de la transcription, ainsi que des protéines impliquées dans la réponse cellulaire à l'interféron ou la régulation de l'apoptose. La reconnaissance de protéases virales ou fragments génomiques par les récepteurs endoplasmiques vont permettre l'activation des voies NFκB induisant la synthèse et la sécrétion de cytokines pro inflammatoires. Outre la synthèse de virions matures, la réplication et la traduction de l'ARN génomique aboutit à une contractilité réduite du cardiomyocyte par découplage dépolérisation-contraction, une moindre réponse interféron de la cellule infectée et finalement la mort du cardiomyocyte infecté par nécrose ou apoptose à la suite d'activation des caspases cellulaires. La lyse des cellules cardiaques permet la libération de nouvelles particules virales pouvant infecter des cellules myocardiques voisines, ce qui explique l'agrégation des cellules infectées en amas<sup>108</sup>. L'immunité adaptative à médiation cellulaire va jouer dans cette phase aiguë un rôle primordial dans la clairance virale cardiaque et les lymphocytes cytotoxiques (CD8+) vont reconnaître les peptides viraux présentés par le CMH de classe I <sup>112</sup>.

## 2. Phase de myocardite subaiguë

Après la phase d'invasion virale et l'activation du système immunitaire inné le système immunitaire bascule vers une réponse spécifique de type cellulaire (réponse de type Th1). Les cellules dendritiques vont présenter les antigènes viraux aux lymphocytes CD8+ dont la qualité de la réponse va moduler profondément l'évolution du patient. On peut observer : (i) une clairance virale, (ii) la destruction ciblée de cardiomyocytes <sup>112,113</sup> mais également (iii) des phénomènes d'auto-immunité et (iv) d'échappement viral à la surveillance du système immunitaire. En effet, des antigènes dérivés de protéines myocardiques partageant des homologies de structures antigéniques avec des protéines virales peuvent induire au cours de cette phase de myocardite subaiguë (**Figure 14**) la production d'auto-anticorps et de cellules T auto-réactives dirigées contre les protéines cardiaques <sup>114,115</sup>. Au cours de cette phase subaiguë de l'infection, les EVs peuvent également échapper au système immunitaire en modulant les fonctions de certaines cellules en particulier celles des cellules dendritiques <sup>7</sup>.

### 3. Guérison ou chronicisation de la myocardite

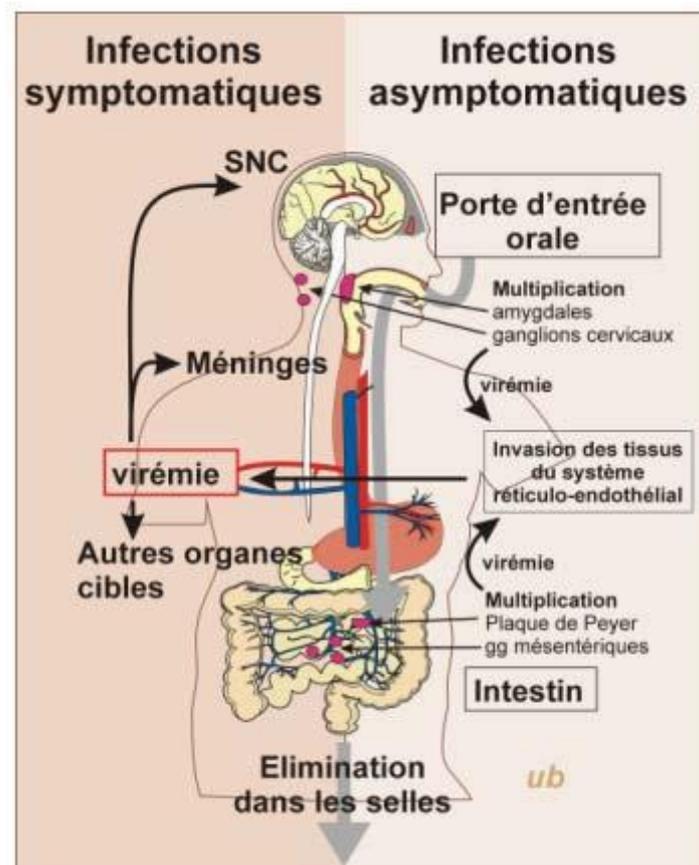
Bien que l'on ne dispose pas de données épidémiologiques exhaustives, la clairance virale et la guérison du fait de la réaction immunitaire innée et adaptative semble l'évolution la plus fréquente à distance soit après une symptomatologie mineure, soit après une évolution initiale catastrophique avec troubles du rythme et insuffisance cardiaque aiguë (myocardite fulminante)<sup>85</sup>. La guérison et la restitution *ad integrum* sont de règle lorsque le patient survit à une myocardite fulminante<sup>85</sup>.

A l'inverse, les dégâts inflammatoires de la myocardite peuvent plus rarement persister jusqu'au stade de myocardite chronique ou au stade clinique de CMD. Deux mécanismes physiopathologiques différents peuvent expliquer cette évolution défavorable (**Figure 14**). Tout d'abord, il peut s'agir du développement d'une myocardite auto-immune évoluant pour son propre compte et due notamment à la synthèse à l'issue de la réponse immunitaire adaptative d'auto-anticorps dirigés surtout contre la myosine cardiaque, démasquée durant l'infection à EV<sup>116,117</sup>. Bien qu'il soit soumis à débat quant à sa capacité à générer une inflammation chronique<sup>118</sup>, le second mécanisme universellement reconnu quant à sa capacité à générer une CMD au décours d'une myocardite<sup>85</sup> est la persistance des EVs dans les cardiomyocytes avec la production de protéase virale 2A capable de cliver la dystrophine cardiaque et d'induire un phénotype de CMD<sup>119,120</sup>. Dans 10% des cas de myocardite à EV, une dilation du ventricule gauche puis bi-ventriculaire va s'installer alors que vont apparaître insidieusement des signes cliniques d'insuffisance cardiaque chronique et évolutive (stade clinique de CMD).

### III. REPONSE IMMUNITAIRE A ENTEROVIRUS

#### A. CARACTERES GENERAUX DE LA REPONSE IMMUNITAIRE AU COURS DE L'INFECTION PAR LES ENTEROVIRUS HUMAINS

Les Entérovirus (EVs) pénètrent dans l'organisme principalement par voie oropharyngée et par voie digestive mais leur transmission se fait également par voies aériennes (aérosols) ou par les muqueuses (conjonctive, sphère oto-rhino-laryngologique [ORL]) à partir de gouttelettes liquidiennes ou de lésions cutanées infectées. La muqueuse épithéliale du rhinopharynx constitue avec les amygdales le premier site de réplication des EVs, leur permettant de diffuser ensuite rapidement vers le tube digestif où ils vont se répliquer au niveau des plaques de Peyer du système lymphoïde intestinal (**Figure 16**).



**Figure 16: Physiologie des infections à Entérovirus.** L'infection se déroule en quatre phases principales : digestive ou respiratoire, lymphatique, virémique permettant l'atteinte des organes cibles (D'après <sup>121</sup>).

Ainsi les cellules dendritiques présentes dans les sous-muqueuses digestives ou respiratoires interviennent précocement dans la reconnaissance du virus par le système immunitaire et elles amplifient les réponses des lymphocytes T et B. Une

première phase de circulation lymphatique permet la mise en place d'une virémie primaire permettant au virus d'atteindre les organes cibles. La réplication active des EVs provoquent dans les organes une destruction des cellules cibles qui déclenche une réponse immunitaire innée cellulaire et cytokinique dont le but est de limiter la propagation de l'infection au niveau local. A cette réponse immunitaire innée fait suite une réponse adaptative qui débute 7 à 10 jours après avec la mise en place d'une immunité spécifique avec l'activation des lymphocytes T et B <sup>122</sup> (**Figure 14**). Le rôle des lymphocytes B, induisant une immunité à médiation humorale, est de sécréter des anticorps neutralisants pour empêcher la survenue d'une infection en bloquant la phase de virémie initiale qui précède la colonisation des tissus cibles. Des anticorps sécrétoires tels que les IgG et IgA sécrétoires (IgAs) peuvent empêcher l'atteinte des tissus cibles en bloquant les virus au niveau de l'oropharynx et de l'intestin. De plus, le système immunitaire à médiation cellulaire permet l'élimination du virus et est associée à la production de cytokines (*tumor necrosis factor* [TNF] alpha, interféron [IFN] de type I [IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ]). Ce sont les lymphocytes T, les cellules *killer* (K) et les cellules *natural killer* (NK) qui jouent un rôle prépondérant dans la réponse immune antivirale <sup>123</sup>.

L'accumulation et l'intensité des réactions immunitaires innées et adaptatives jouent un rôle important dans les mécanismes inflammatoires, responsables des lésions tissulaires et par conséquent de la sévérité et la durée des signes cliniques observées. La modulation de la réponse inflammatoire et de l'activation des cellules immunes au cours de la mise en place d'une infection par les EVs va déterminer l'apparition d'une réaction auto-immune humorale ou cellulaire présente dans certaines infections chroniques persistantes à EVs comme le diabète de type I ou les myocardites chroniques <sup>124-126</sup>. Cependant, les EVs peuvent mettre en jeu des stratégies pour échapper à la surveillance du système immunitaire en sélectionnant certains variants viraux (ARN génomiques mutés ou tronqués) ou en modulant la fonctionnalité de certaines cellules du système immunitaire comme les cellules dendritiques <sup>127</sup>.

## **B. L'IMMUNITE CELLULAIRE AU COURS DE L'INFECTION PAR LES ENTEROVIRUS HUMAINS**

Au cours de la phase d'entrée du virus les sous-muqueuses digestives ou respiratoires, les cellules dendritiques interviennent précocement (au bout de 4 jours) dans la reconnaissance du virus. Elles ont un rôle essentiel de cellules présentatrices d'antigène (CPA) capable d'amplifier les réponses T et B permettant d'induire une réponse immunitaire spécifique de type Th1 ou Th2 et le recrutement des cellules inflammatoires au site de l'infection. Une infiltration de cellules inflammatoires telles que les cellules *NK* et les macrophages induit une production importante de cytokines pro-inflammatoires comme le *tumor necrosis factor* (TNF) et interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) qui vont limiter localement la propagation de l'infection virale dans les cellules cibles. Cette réponse pro-inflammatoire va permettre une clairance virale de l'organe infecté caractérisée par l'absence de virus infectieux dans les tissus cibles 5 à 14 jours après la phase d'invasion de l'organe <sup>128,129</sup>. Ainsi la réponse de type cellulaire avec l'activation des cellules NK, K et des macrophages joue un rôle primordial dans la clairance virale des tissus infectés et va permettre la mise en place de l'immunité adaptative <sup>130</sup>.

## **C. L'IMMUNITE HUMORALE AU COURS DE L'INFECTION PAR LES ENTEROVIRUS HUMAINS**

La mise en place de l'immunité à médiation humorale se fait à partir du 6<sup>ème</sup> ou 7<sup>ème</sup> jour post-infection avec l'arrivée de populations lymphocytaires et d'anticorps neutralisants <sup>122</sup>. Ces anticorps neutralisants sériques vont permettre d'empêcher la survenue d'une infection à EV en bloquant lors de la phase de virémie initiale la colonisation des tissus cibles. Les anticorps sécrétoires (IgA, IgA dimériques ou IgG) peuvent empêcher l'atteinte des tissus cibles en bloquant les virus au niveau de l'oropharynx et de l'intestin. De plus, des antigènes viraux ou cellulaires démasqués par l'infection à EV vont également être reconnus par les lymphocytes B directement ou par les lymphocytes T grâce aux CPA. Il s'en suit une expansion clonale des lymphocytes activés qu'ils soient B, T CD4+ Helper ou T CD8+ cytotoxiques. Les éléments déterminant l'orientation (Th1 ou Th2) de cette réaction immunitaire adaptative sont méconnus mais elle peut être tant bénéfique pour l'hôte avec la clairance virale et la guérison que néfaste avec le développement d'une myocardite

auto-immune, comme en témoigne l'existence de modèles de Myocardite Auto-immune Expérimentale (MAE) notamment avec la genèse d'anticorps anti-myosine cardiaque <sup>116,117</sup>. En plus de perturber la migration vers la membrane cellulaire des antigènes viraux que pourrait présenter le cardiomyocyte infecté <sup>131</sup>, les EVs sont capables de moduler la réaction immunitaire adaptative en clivant les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe 1 (CMH-I), empêchant les cellules infectées de présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques <sup>8</sup>.

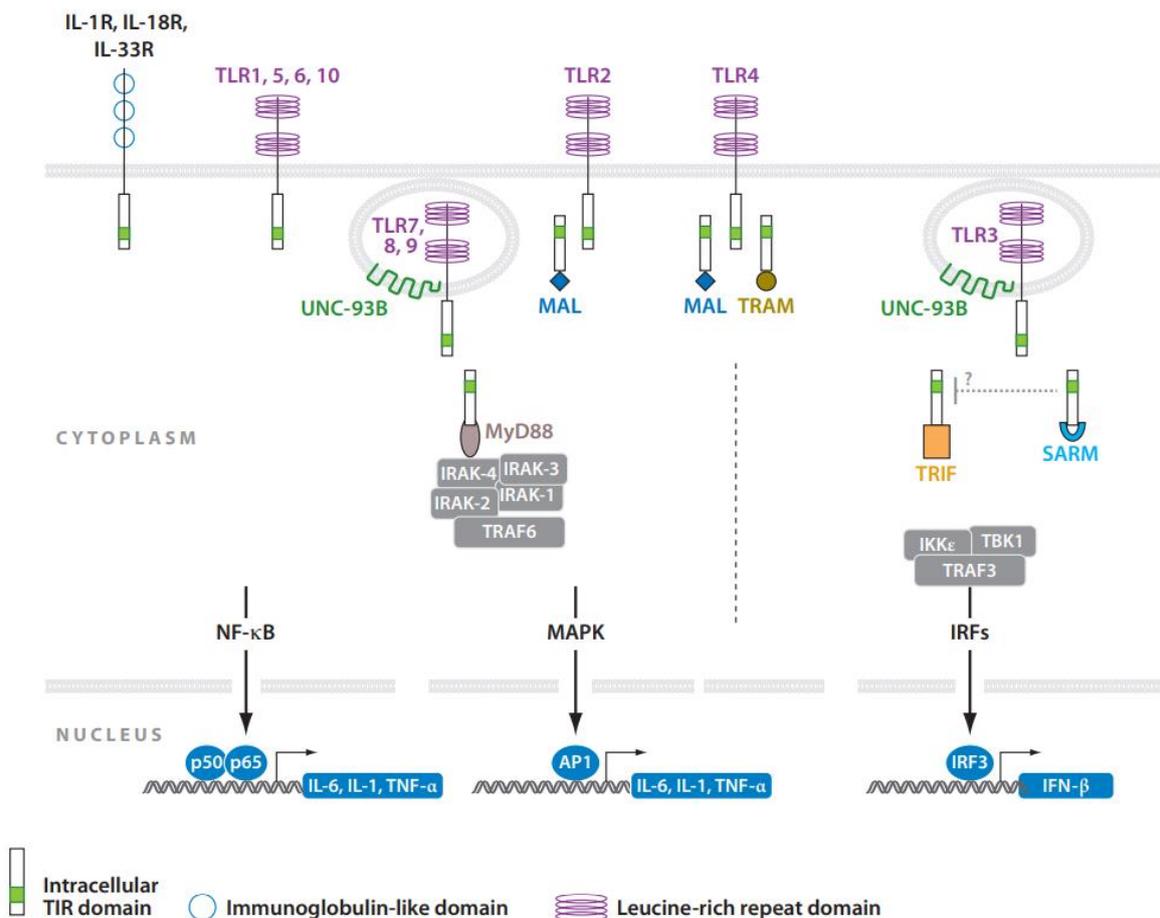
#### D. IMMUNITE INNEE A ENTEROVIRUS

Le système immunitaire inné joue un rôle essentiel dans la reconnaissance des agents pathogènes et l'initiation de la réponse immunitaire grâce à la reconnaissance des profils moléculaires associés aux agents pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Pattern*, PAMP) et ceci par ses récepteurs de reconnaissance de profils (*Pattern Recognition Receptor*, PRR). Les acides nucléiques viraux, Acide RiboNucléique (ARN) ou Acide DésoxyriboNucléique (ADN) sont reconnus comme des PAMPs. Les PRRs sont des éléments incontournables dans la détection et l'induction de la réponse innée aux agents pathogènes qui pourra induire une clairance virale. Parmi ces senseurs de l'immunité que sont ces PRRs on retrouve *les Toll-Like Receptors* (TLRs) avec le TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, les *RIG-I Like Receptors* (RLRs) avec RIG-I (*Retinoic acid Inductible Gene-I*), MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) et LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*), et enfin les *NOD-Like Receptors* (NLRs).

##### 1. Détection des Entérovirus par les récepteurs Toll-like ou Toll-like receptors (TLRs)

Les *Toll-like receptors* (TLRs), premier groupe de PRR identifiés, sont au nombre de 10 chez l'homme et de 13 chez la souris. Ils reconnaissent une variété de PAMP et sont responsables de la détection des signaux de stimuli pathogènes invasifs <sup>132,133</sup>. Les TLRs sont des protéines conservées évolutivement qui peuvent être extracellulaires ou intracellulaires, et jouent un rôle important dans la mise en place de l'immunité antivirale de l'hôte <sup>134,135</sup>. Les TLR-3, -4, -7, -8, -9 sont impliqués dans

l'immunité antivirale. Après liaison par des fragments viraux d'ADN ou d'ARN et de protéines, ces TLRs sont capables d'initier un changement de conformation de la structure de leurs domaines extracellulaires et cytoplasmiques pour recruter des molécules adaptatrices dans leurs voies de signalisation, qui vont ensuite activer les composants principaux que sont *Nuclear Factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) et *Activator Protein-1* (AP-1) dans la réponse immunitaire innée (**Figure 17**)<sup>136-138</sup>.



**Figure 17: Les voies de signalisations des TLRs impliquées dans la réponse antivirale.** Les TLRs activés recrutent des protéines spécifiques capables d'activer soit la voie canonique (MyD88), soit la voie alternative (TRIF). Les protéines contenant un domaine intracellulaire TIR agissent comme des co-adaptateurs spécifiques (MAL ou TRAM) ou peut-être des régulateurs négatifs (SARM) des complexes TIR. S'ensuit une cascade d'activation des complexes kinases spécifiques (IRAKs ou IKK $\epsilon$  / TBK1), conduisant à l'expression de gènes spécifiques via les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, AP1 et IRF. (Abréviations: IKK $\epsilon$  / TBK1, I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  / TANK-binding kinase 1; IRAK, Kinase associée à l'IL-1R; MAL, type adaptateur MyD88; SARM, protéine stérile  $\alpha$  et HEAT / motif tatou; TIR, récepteur Toll-IL-1; TRAM, molécule adaptatrice liée au TRIF; TRIF, IFN- $\beta$  induisant l'adaptateur contenant un domaine TIR.). D'après<sup>139</sup>

Le TLR3 est un récepteur endosomal, exprimé de façon constitutive dans la plupart des cellules, capable de reconnaître l'ARN double brin <sup>140</sup>. Le TLR3 assure la médiation d'une réponse interféron (IFN) via un adaptateur contenant le domaine du récepteur Toll / IL-1 induisant l'interféron bêta (TRIF, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) et le facteur de régulation de l'interféron appelé IRF3 (*IFN regulatory factor 3*). La réponse antivirale médiée par TLR3 s'est avérée importante dans la lutte contre le poliovirus (PV), le virus coxsackie A16 (CVA-16), et le virus coxsackie B3 (CVB-3) <sup>141,142</sup>. De plus, des études *in vitro* ont souligné l'importance de l'adaptateur TRIF pour l'induction d'une réponse IFN antivirale efficace lors d'une infection à EV <sup>143</sup>. Ces travaux confirment l'importance du TLR3 dans l'infection à EV. Cependant, d'autres TLRs peuvent également jouer des rôles importants tel que le TLR4 qui est connu pour détecter lors d'une infection principalement le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram-négatives. TLR4 s'est aussi révélé important dans la myocardite aiguë provoquée par une infection par le virus coxsackie B3 (CVB-3) <sup>144,145</sup>. Il est également connu que le TLR4 est impliqué dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires et le développement de pathologies cliniques tel que le diabète de type I et les cardiomyopathies à EV <sup>145</sup>.

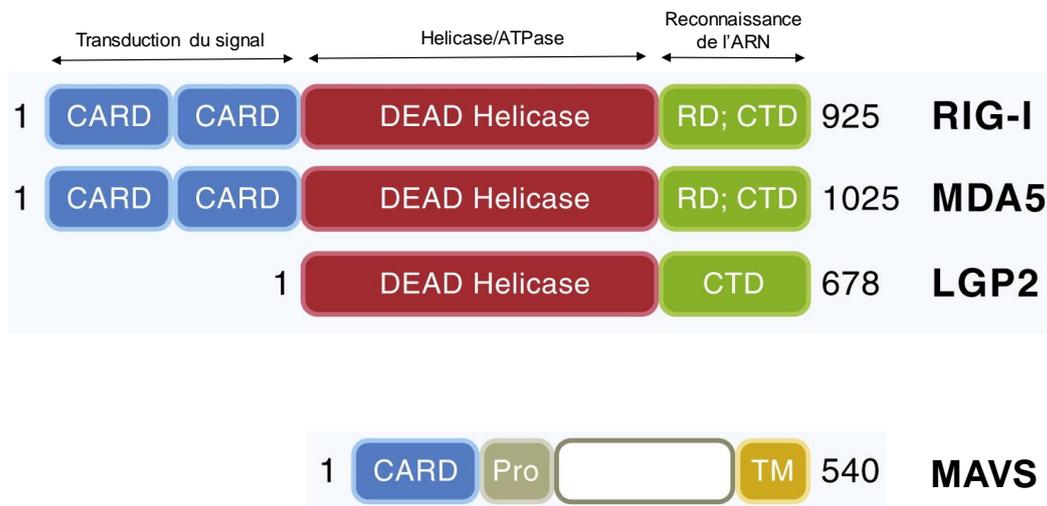
Parmi les TLRs on retrouve aussi les récepteurs endosomaux TLR7 et TLR8 qui détectent l'ARN simple brin (ARNsb) lors d'une infection entérovirale <sup>146</sup>. Ces PRRs semblent jouer un rôle majeur dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires. Outre ces PRRs décrit précédemment, les RLRs et les NLRs sont également chargés de détecter les signaux pathogènes viraux intracellulaires et d'induire les phénomènes d'apoptose des cellules infectées via l'activation de la voie NF-κB <sup>147</sup>. Ce processus global a été identifié comme une étape clé de l'immunité innée et de la mise en place de l'immunité adaptative <sup>132</sup>.

## 2. Détection des Entérovirus par les récepteurs RIG-I ou RIG-I-like receptors (RLRs)

### a) Présentation et caractéristiques structurales

Le système immunitaire inné est capable de détecter un large éventail d'infections virales permettant ainsi la mise en place d'une réponse antivirale rapide non spécifique. Lors de cette réponse, la signalisation antivirale cellulaire est initiée par la reconnaissance des acides nucléiques viraux. L'infection par des virus à ARN

entraîne une accumulation cytosolique d'ARN double brin (ARNdb) considérés comme des PAMPs capable d'activer plusieurs familles de récepteurs comme les RLRs, PKR (*Protein kinase R*) ou OAS (2'-5'-oligoadénylate synthétase). Afin de distinguer le soi du non-soi au niveau du cytosol cellulaire, il existe des motifs discriminants comme la présence de groupement tri-phosphate à l'extrémité 5' de la séquence génomique du virus <sup>148-150</sup>. Parmi les senseurs cytosoliques on retrouve les *Retinoic acid-Inducible Gene 1* [RIG-I] *-Like Receptors* (RLRs). Au sein de cette superfamille d'hélicases, on dénombre actuellement trois hélicases à ARN cytoplasmique que sont *Retinoic acid Inducible Gene* (RIG-I), *Melanoma Differentiation-Associated 5* (MDA5) et *Laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP2) <sup>151-155</sup>. RIG-I et MDA5 sont tous les deux caractérisés par une répétition de deux domaines de recrutement des caspases en position N-terminale appelés *CAspase Recruitment Domain* (domaines CARD). Ce domaine est également présent au niveau de leur adaptateur mitochondrial commun appelé *CARD adaptor inducing IFN-β* (CARDIF) ou *IFN-β Promoter Stimulation* (IPS-1) ou *Mitochondrial AntiViral Signaling protein* (MAVS) (**Figure 18**). Les domaines CARD sont régulés par des modifications post-traductionnelles telle que l'ubiquitination et la phosphorylation <sup>152,156-158</sup>. Même si tous les RLRs, notamment LGP2, ne possèdent pas de domaine CARD, chacun des récepteurs possède un domaine hélicase conservé à motif « DEAD box » ATPase dépendant. A leur extrémité carboxy-terminale (C-terminale), les RLRs possèdent un domaine conservé appelé CTD (*C-Terminal Domain*) qui est responsable de la spécificité d'attachement aux ARN viraux que ce soient des ARNdb, ARNsb ou présentant un groupement tri-phosphate à l'extrémité 5' (**Figure 18**). Ce domaine à l'extrémité C-terminale est un domaine répresseur (RD, Repressor Domain) qui inactive les domaines CARDS et dont la fonction de régulation négative n'a été observé que pour les récepteurs RIG-I et LGP2 <sup>159</sup>.



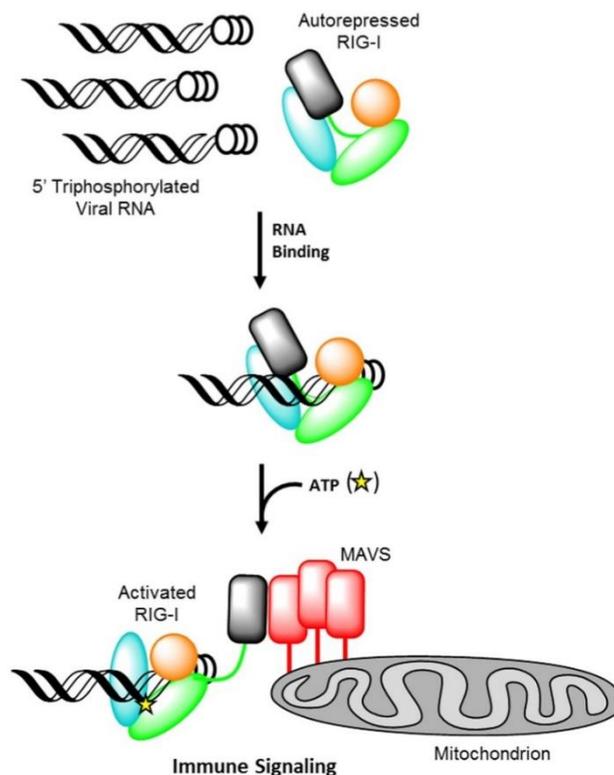
**Figure 18: Représentation schématique des structures des RIG-I Like Receptors (RLRs) et leur adaptateur MAVS.** Les domaines structurels clés impliqués dans la signalisation sont présentés. Les RLR sont constitués de domaines CARD (domaine d'activation et de recrutement des caspases); d'un domaine ATPase contenant une hélicase DEAD box (DEAD helicase); et d'un domaine C-terminal (CTD) présent chez RIG-I et LGP2 mais pas MDA5 et qui code pour un domaine répresseur (RD) impliqué dans l'autorégulation. LGP2 n'a pas de domaine CARD N-terminal. IPS-1, appelé aussi MAVS se compose d'un domaine CARD homologue, d'une région riche en proline (Pro) et d'un domaine transmembranaire (TM) à son extrémité C-terminale.

La spécificité de reconnaissance de certaines familles de virus permet de caractériser les RLRs ; RIG-I est activé par de nombreux virus tels que les Paramyxovirus, les Orthomyxovirus, les Rhabdovirus, les Flavivirus et le virus de l'Hépatite C <sup>148,149</sup>, tandis que MDA5 reconnaît majoritairement les virus de la famille des *Picornaviridae* et plus spécifiquement les Entérovirus du groupe B dont les virus Coxsackie du groupe B <sup>152,156</sup>.

b) Retinoic acid-Inducible Gene-1 (RIG-I) : activations et spécificité de ligands

RIG-I est le premier membre de la famille des RLRs reconnu et le mieux caractérisé aujourd'hui. En l'absence de ligand, RIG-I est dans un état « inactif » avec les deux domaines CARDS en interaction avec le domaine Hel2i de l'hélicase (**Figure 19**) <sup>159</sup>. Cette conformation empêche les domaines CARD de se lier à la polyubiquitine ou à des domaines CARDS provenant d'autres partenaires de liaison tels que MAVS <sup>160</sup>. Lors de la liaison de l'ARN au domaine RD de l'extrémité C-terminale de RIG-I, la conformation de RIG-I se modifie de telle sorte que l'ARN se lie préférentiellement à Hel-2i et lève l'auto-inhibition des deux domaines CARDS. Ce changement de conformation permet à l'ATP de lier RIG-I, étape indispensable à l'activation de RIG-I

(Figure 19) <sup>161-163</sup>. Ensuite, par la liaison de K63 polyubiquitination/ polyubiquitine aux deux domaines CARDS et/ou la formation de filaments par l'hélicase le long de l'ARN db, les deux domaines CARDS adoptent une conformation tétramérique plus stable, qui activé va interagir avec l'adaptateur mitochondrial MAVS (Figure 19) <sup>164-170</sup>. Ce qui permettra ensuite l'activation d'une cascade de signalisation TRAF3/ TBK1/ IKKε et TRAF6/ IKK qui activeront eux-mêmes les facteurs de transcription IRF3 et NFκB, qui stimulent respectivement la production d'IFN de type I et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, <sup>171</sup>.



**Figure 19: Activation de l'acide rétinoïque inducible gene I (RIG-I) par liaison de l'acide ribonucléique viral (ARN).** La protéine RIG-I comprend quatre grands groupes de domaines, dont les domaines d'activation et de recrutement des caspases (CARD) (noirs), le noyau d'ATPase stimulé par l'ARN (vert), un domaine de régulation et de liaison inséré dans le deuxième lobe de l'ATPase appelé HEL2i (cyan), et un domaine de reconnaissance du triphosphate et de liaison à l'ARN à l'extrémité c-terminale annoté le domaine C-terminal (CTD) (orange). RIG-I est normalement présent dans les cellules dans une conformation inactive avec les domaines CARDS masqués par le domaine HEL2i. Lors de l'infection par des virus à ARN ou à ADN, RIG-I se lie aux terminaisons 5' terminale triphosphorylées de l'ARN viral (hélice noire avec trois cercles blancs) dans le cytoplasme. La liaison à l'ARN stimule la liaison à l'ATP (étoile jaune) et l'hydrolyse par RIG-I (triangle jaune). Ceci permet à RIG-I d'avoir une conformation active pour induire une cascade de signalisation immunitaire par une interaction avec la protéine adaptatrice MAVS (rouge). D'après <sup>172</sup>

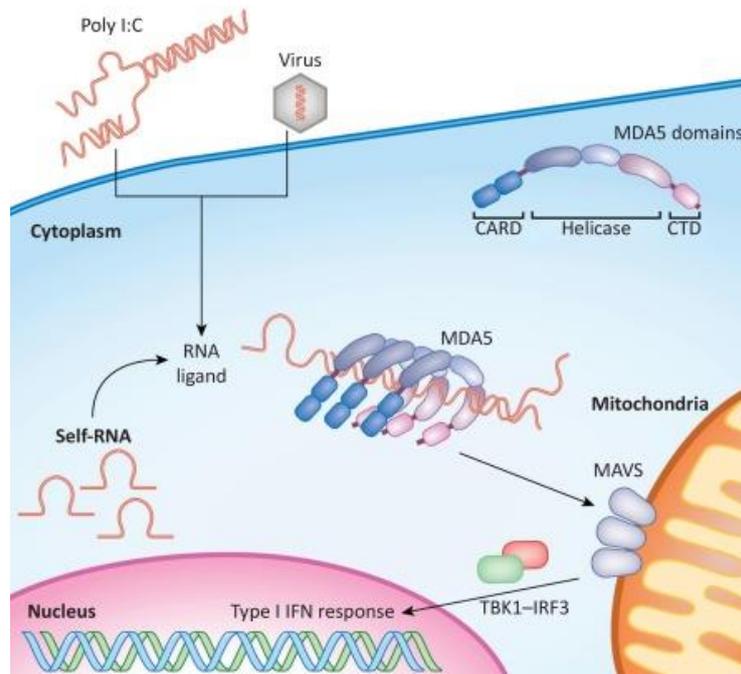
RIG-I reconnaît des ligands nombreux et variés qui reflètent la grande capacité de détection des virus à ARN positif ou négatif par ce récepteur. Des études récentes ont démontré que RIG-I se lie préférentiellement à des ARN de petite taille (<300 pb) ayant

des extrémités franches, ce qui facilite la discrimination entre les molécules du soi et du non-soi <sup>164-166,173,173-176</sup>. En plus de reconnaître les ARNs de petite taille, RIG-I reconnaît les virus à ARN de polarité négative qui génèrent de nombreux petits ARNs avec un groupement triphosphate en 5' au cours de leurs mécanismes de réplication génomique tels que le virus de la rougeole (MV, Measle Virus), les Paramyxovirus (SeV), les Rhabdovirus comme le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et le virus de la rage (RV), ainsi que des virus de la famille des Orthomyxovirus comme les virus de la grippe. RIG-I reconnaît également les intermédiaires de réplication ARNdb, qui présentent une structure double brin des virus à ARN simples positifs, tels que le virus de l'hépatite C (VHC) et le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) de la famille des Flavivirus ou encore de virus à ADN tels que l'adénovirus, le virus de la vaccine, le virus de l'herpès simplex (HSV) <sup>152,154,177</sup>.

Récemment il a été démontré l'importance de la séquence de la molécule d'ARN pour sa reconnaissance par RIG-I. En effet, la présence de séquences riches en U et en A en 3' et d'un groupement triphosphate en 5' favorise l'activation de RIG-I et leurs capacités à induire la sécrétion des IFNs de type I <sup>178,179</sup>. Les ARNs dépourvus d'un groupement triphosphate en 5' ne semblent pas stimuler RIG-I. Par conséquent, les ARNm coiffés tels que les ARNm de la cellule hôte et la plupart des ARNm des virus à ADN ne peuvent pas activer RIG-I. L'ARN des EVs étant coiffé par une VPg à l'extrémité 5' non-codante du génome viral, il n'est pas reconnu par RIG-I. Conformément à cette observation, les souris dépourvues de RIG-I (KO-RIG-I) ne montrent pas une sensibilité accrue à l'infection par des Picornavirus <sup>152</sup>. D'autre part il a été montré que RIG-I est dégradée dans les cellules infectées par les EVs via les protéines virales produites lors de la réplication ; la protéase 2A est connue pour cliver MDA5 et la protéase 3C a été démontré in vitro comme capable de cliver RIG-I malgré le fait que RIG-I apparaisse comme peu contributif à la réponse innée contre ces virus <sup>180,181</sup>.

c) Melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5) :  
spécificité de ligands

MDA5 a été décrit pour la première fois en 2002, et identifié comme étant un senseur cytosolique d'ARN viraux dans les cellules infectées de souris et humaines<sup>151,182,183</sup>. MDA5 possède un mécanisme d'activation similaire à RIG-I avec la liaison de l'ARN au domaine RD-helicase. Cette liaison induit un changement de conformation du domaine N-terminal. La particularité de MDA5 est de lier des ARNdb de longue taille (> 1-2 kb)<sup>174</sup> ce qui lui confère un avantage à former une structure tétramérique avec les 2 domaines CARD plus stable par la formation d'un filament dans l'ARNdb viral qui est moins dépendant de la liaison de la chaîne d'ubiquitine à K63 (**Figure 20**)<sup>184,185</sup>. Le ligand naturel de MDA5 reste mal défini et il est actuellement considéré comme les longs ARNdb. Au cours de leur réplication les virus de la famille des *Picornaviridae* sont connus pour produire d'importantes quantités de forme ARN de polarité négative (intermédiaire de réplication) et double brin et ceci notamment les virus à ARN de polarité positive comme l'encephalomyocarditis virus (EMCV), le PV, les Rhinovirus, le virus Coxsackie B (CV-B) détecté préférentiellement par MDA5 dans des cellules cibles en culture<sup>142,152,155,175,177,186</sup>. Le virus de la Dengue et les Réovirus sont reconnus à la fois par RIG-I et par MDA5<sup>156,159</sup>. Il a été démontré que MDA5 pouvait détecter des ARNdb synthétiques de très grande taille tel que le poly (I:C) (polyionosic : polycytidylic) sans la présence de motif tri-phosphate en 5'<sup>178</sup>. Par contre, il a été démontré que le poly(I:C) pouvait être converti en un ligand pour RIG-I en diminuant la longueur d'ARNdb par digestion spécifique de l'ARNdb par la RNaseIII (endonucléase)<sup>187</sup>. De récents travaux ont décrit *in vivo* les effets de l'infection à CVB3 sur MDA5<sup>175</sup>. Actuellement, MDA5 semble jouer un rôle important dans la régulation des titres infectieux d'Entérovirus et ceci précocement lors de l'infection aigüe chez les souris C57BL/6 IFN- $\alpha$  /  $\beta$ R<sup>-/-</sup> et B6.129 MAVS<sup>-/-</sup>. Cependant l'effet n'apparaît que transitoirement, retardant la production de nouveaux virions de façon indépendante de la production d'IFN de type 1 dans ce modèle murin<sup>175</sup>.



**Figure 20 : Voie de signalisation de MDA5.** MDA5 comprend deux domaines CARDS N-terminaux, un domaine hélicase central et un domaine C terminal (CTD). Le domaine de l'hélicase et le CTD sont tous deux impliqués dans la liaison de l'ARN. MDA5 reconnaît les ARN synthétiques, tels que les poly I: C, les ARNs viraux et les ARNs endogènes. La longueur et la structure secondaire sont susceptibles d'être des déterminants clés de l'activation de MDA5. L'activation de la protéine adaptatrice MAVS déclenche une cascade de signalisation impliquant TBK1 et IRF3, conduisant à l'induction transcriptionnelle des gènes codant pour les IFN de type I et d'autres gènes antiviraux. CARD, domaine d'activation et de recrutement des caspases; MAVS, protéine de signalisation antivirale mitochondriale. D'après <sup>188</sup>.

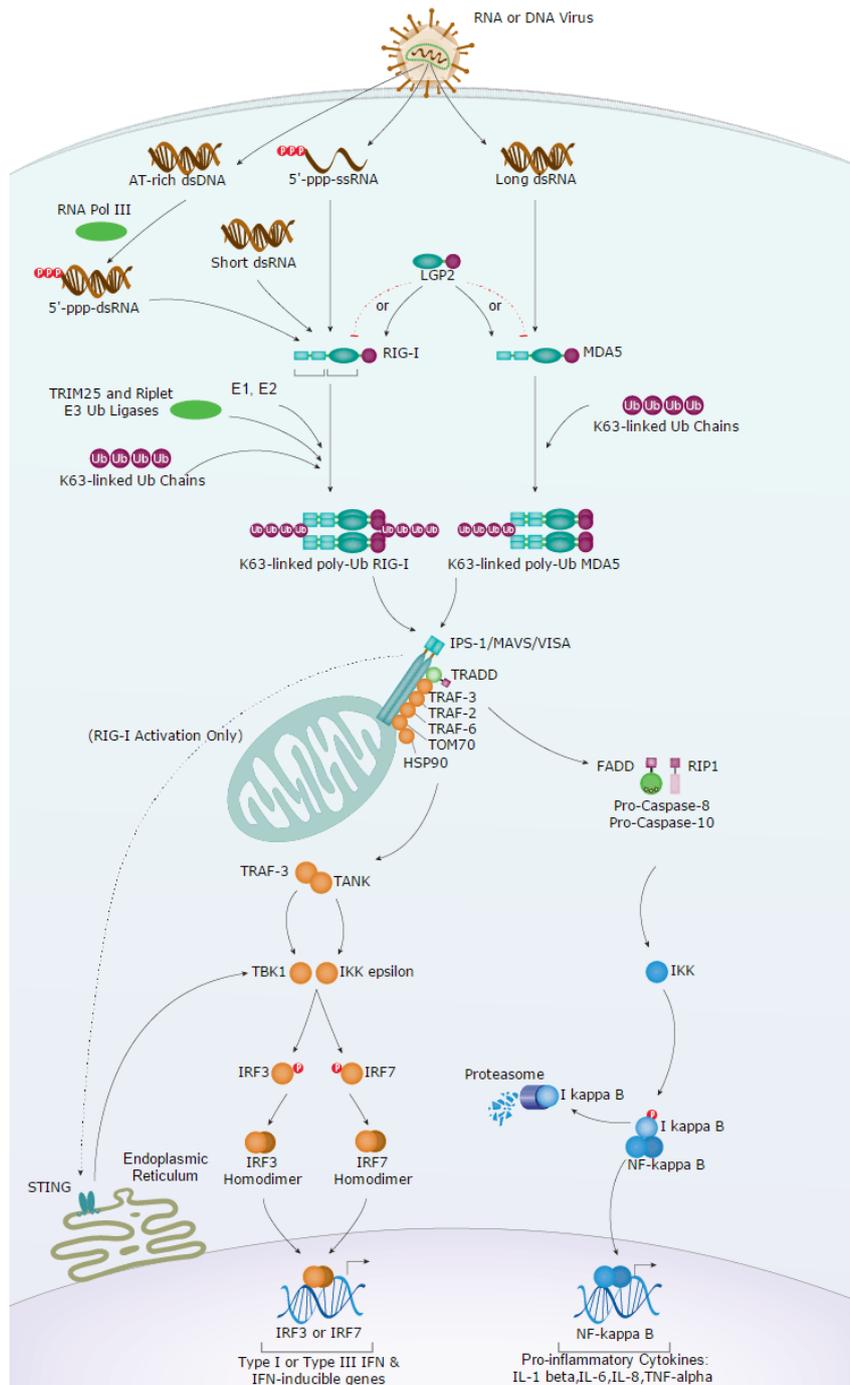
d) Laboratory of Genetics and Physiology 2 (LGP2) : spécificité de ligands, rétrocontrôle

LGP2 est un RLR aussi connu sous le nom de Dhx58, et qui est une troisième hélicase de type DexD/H. Elle possède un domaine hélicase DExD/H et un domaine RD à l'extrémité C-terminale mais diffère des deux autres senseurs RIG-I et MDA5 car il ne possède pas de domaine CARD et donc n'induit pas de synthèse d'IFN de type 1. Il agirait comme un inhibiteur de RIG-I en séquestrant les ARN viraux double brin. Son domaine hélicase DExD/H en milieu de séquence, homologue à MDA5, lui permet cependant d'interagir avec des ARN exogènes, et son domaine RD à l'extrémité C-terminale homologue à RIG-I lui permettrait de discriminer les différentes extrémités de l'ARN. LGP2 serait donc susceptible d'interférer avec l'activation des RIG-I en liant les ARN viraux double brin par son domaine RD. Au début de l'infection, LGP2 favoriserait la détection des ARN viraux par MDA5. Il contrôlerait ensuite négativement MDA5 à la suite de la stimulation des cellules par les IFNs et de l'augmentation de son expression. Cependant le rôle exact de LGP2 dans la régulation de la production d'IFN

lors d'une infection virale reste encore à préciser au cours de l'infection des différentes cellules cibles par les EVs humains.

e) Voie de signalisation des RLRs

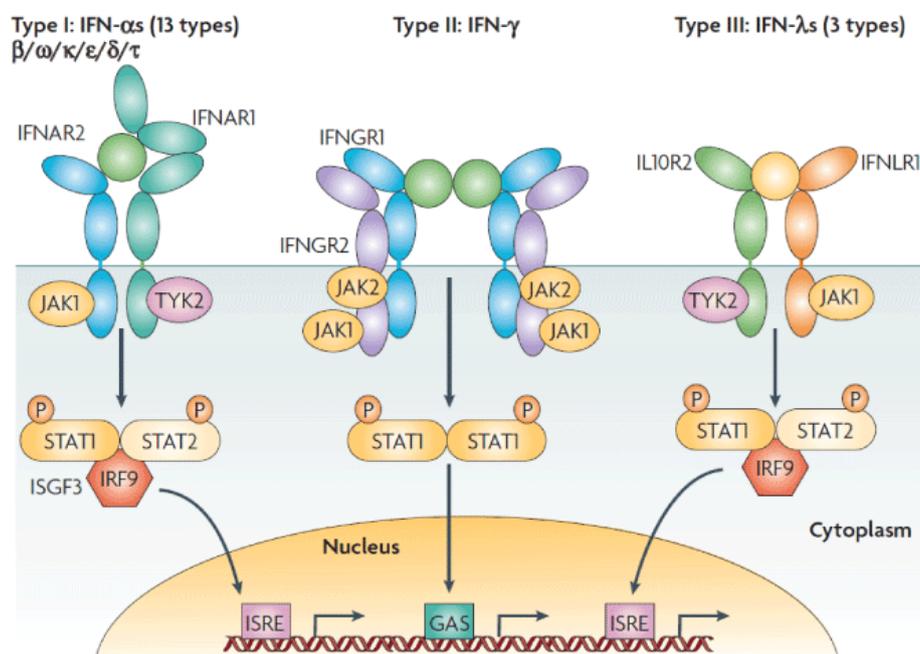
Après la reconnaissance de leurs ligands spécifiques, RIG-I et MDA5 vont interagir avec un adaptateur clé dans la voie mitochondriale d'activation de la réponse IFN de type I : la protéine MAVS, aussi connue sous le nom IPS-1, VISA ou bien CARDIF<sup>164,165,173</sup>. Cette protéine MAVS possède en son centre une région riche en proline appelée PRR (*proline-rich region*) encadrée à son extrémité N-terminale d'un domaine capable d'interagir avec les domaines CARD de RIG-I et MDA5. A son extrémité C-terminale celle-ci possède un domaine transmembranaire permettant son ancrage à la membrane mitochondriale et à la surface des peroxysomes<sup>177,189</sup> (**Figure 18**). La reconnaissance du ligand induit un changement de conformation et une oligomérisation des récepteurs RIG-I et MDA5 à la suite de l'ubiquitination des deux domaines CARD par TRIM25. Une fois activés, RIG-I et MDA5, se lient à MAVS via leurs domaines CARD respectifs, induisant par la suite l'activation de MAVS via l'oligomérisation des dimères de MAVS (**Figure 21**). L'activation de MAVS permet le recrutement de plusieurs facteurs dont des membres de la famille TRAF (*Tumor necrosis factor (TNF) Receptor-Associated Factor*)<sup>190,191</sup>. Le recrutement de TRAF3 permet ensuite l'activation de trans-activateur du gène de l'IFN- $\beta$ , IRF-3/7 et NF $\kappa$ B, grâce à la signalisation induite par les protéines kinases IKK (*Inhibitor of NF $\kappa$ B Kinase*). Le recrutement de TBK1 et IRF-3 au niveau de MAVS est assuré par la protéine STING (*STimulator of INterferon Genes*)<sup>192-195</sup>. STING est une protéine transmembranaire qui est requise pour la production d'interféron de type 1 à la suite d'une infection virale et est située en aval des RLRs et de MAVS (**Figure 21**). Le nombre important de composants impliqués dans la transmission du signal à partir de l'ARN viral cytoplasmique jusqu'à l'activation de NF $\kappa$ B et IRF-3 et 7 permet d'établir de nombreux points de contrôle dans la voie de signalisation<sup>196</sup>.



**Figure 21: La voie de signalisation RIG-I / MDA5.** RIG-I et MDA5 sont d'abord activées par reconnaissance de l'ARNdb PAMP, ce qui les amène à interagir avec MAVS. Suite à l'activation de MAVS par RIG-I / MDA5, une cascade moléculaire implique l'interaction de IKK $\epsilon$  et TBK1, qui est suivie par la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7, assurez-vous de translocaliser les p-IRF3 et p-IRF7 phosphorylés dans le noyau, où ils se dimérisent et se lient aux sites de liaison des facteurs de transcription des gènes IFN $\alpha$  et IFN $\beta$  pour activer leurs transcriptions. L'expression et l'exportation de ces gènes dans le milieu cellulaire déclenche la cascade de signalisation IFN1 de manière autocrine ou paracrine pour induire l'expression de certaines de gènes stimulés par l'interféron (ISG) et de gènes inflammatoires pour conférer une résistance antivirale. RIG-I et MDA5 activent également la voie NF- $\kappa$ B. RIG-I semble agir en amont de la voie canonique, ce qui entraîne la translocation des deux unités fonctionnelles NF- $\kappa$ B (p50 et p65) dans le noyau, tandis que MDA5 semble affecter l'expression de NF- $\kappa$ B indépendamment de cette voie. D'après Brisse and Ly, Front. Immunol, 2019 and R&D systems pictures intitulé *Virus Detection and Induction of Antiviral Signaling Pathways by RIG-I-like Receptors (RLR)*.

### 3. Les interférons (IFN) ; des effecteurs principaux de la réponse antivirale

Les IFN sont des glycoprotéines de la famille des cytokines, molécules de signalisation contrôlant le système immunitaire en induisant l'expression d'effecteurs antiviraux. Ils ont été découverts en 1957 par Isaac et Lindemann qui ont montré que le milieu de culture des cellules infectées par le virus de la grippe conférait une résistance aux cellules avoisinantes vis-à-vis de l'infection, suggérant l'existence d'un facteur protecteur dans le milieu capable d'interférer avec la dissémination du virus <sup>197</sup>. D'où leur appellation d'interférons en référence à leur capacité d'interférer avec la réplication virale <sup>198</sup>. Les interférons sont classés selon leurs propriétés et leur origine en 3 types : les IFNs de type I comprenant les IFN- $\alpha$  et  $\beta$  principalement (ainsi que les IFN- $\omega$ , - $\epsilon$ , - $\tau$ , - $\delta$ , - $\kappa$  and - $\theta$  moins connus), les IFNs de type II (IFN- $\gamma$ ) qui eux joue un rôle prépondérant de molécule de communication entre des cellules spécialisées du système immunitaire et les IFNs de type III (IFN- $\lambda$ ) impliqués dans l'immunité innée antivirale dans la plupart des cellules de l'organisme (**Figure 22**).



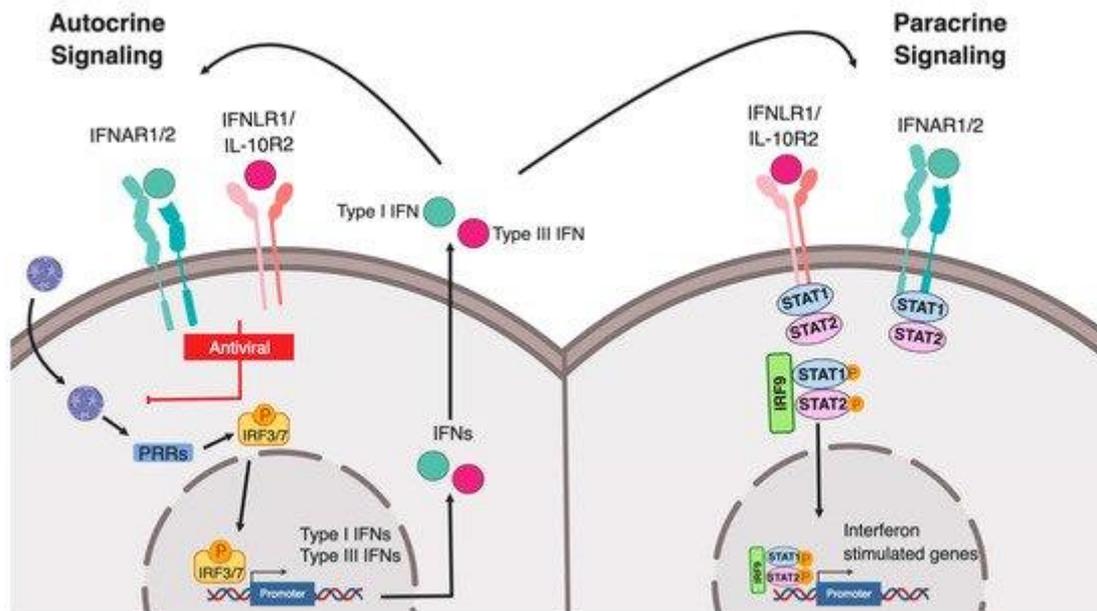
**Figure 22: Les différents types d'interférons et leur voie de signalisation.** Les IFNs de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ), les IFNs de type II (IFN- $\gamma$ ) et les IFNs de type III (IFN- $\lambda$ ) se lient respectivement aux récepteurs IFNAR1/IFNAR2, IL28R $\alpha$ /IL10R $\beta$  et IFNGR1/IFNGR2. Les IFNs de type I et III activent tous la même voie de signalisation induisant l'expression des ISGF3 et STAT1 contrairement aux IFNs de type II qui n'activent que STAT1. (IFN : Interféron ; ISRE : interferon-stimulated response element D'après <sup>199</sup>.

#### a) Les différents types d'interféron

Tout d'abord, les acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée antivirale sont les interférons de type I divisés en plusieurs sous-types : les IFN- $\alpha$  (13 sous-types) et IFN- $\beta$  (1 sous-type) les plus courants et les plus étudiées <sup>200</sup> et les IFN- $\epsilon$  ou IFN- $\omega$  moins étudiés et dont l'action est limitée à certains organes <sup>201</sup>. Les IFNs de type I sont produits par la plupart des cellules et ont une action antimicrobienne. Ils stimulent la mise en place de mécanismes de défense contre différents virus et agissent précocement après l'infection. Ils agissent de manière autocrine et paracrine en s'associant au récepteur dimérique IFNAR1/2 (**Figure 23**).

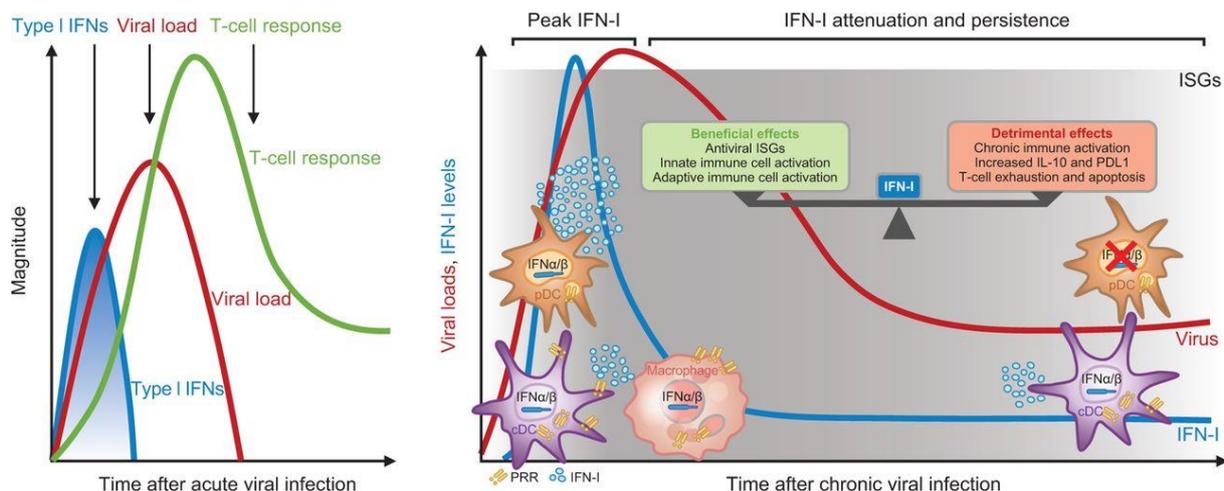
Parmi les IFNs de type II il n'existe qu'un seul sous-type, les IFN- $\gamma$  qui sont principalement sécrétés par les cellules du système immunitaire telles que les monocytes/macrophages, les cellules NK, et les lymphocytes T cytotoxiques <sup>202</sup>. Les IFN- $\gamma$  sont structurellement différents des IFNs de type I et vont activer et amplifier la réponse immunitaire cellulaire par attachement à son récepteur dimérique appelé IFNGR (**Figure 23**).

Enfin les IFN de type III ne possèdent eux aussi qu'un seul sous-type d'IFN, les IFN- $\lambda$ . Décrits récemment, on retrouve dans cette classe les IFN- $\lambda$ 1,  $\lambda$ 2 et  $\lambda$ 3, aussi nommés IL29, IL28A et IL28B <sup>201-204</sup>. Ces IFNs reconnaissent un récepteur qui leur est spécifique composé d'IL10R2 (aussi nommé CRF2-4) et IFNLR1 (aussi nommé CRF2-12) (**Figure 23**). Ils ont une action antivirale complémentaire à celle des IFN de type I dans les tissus les plus exposés aux infections (tube digestif, système respiratoire, etc.). Les IFNs de type I et III induisent des groupes de gènes similaires par des voies de signalisation identiques et aboutissent à la synthèse d'importants médiateurs de la réponse antivirale <sup>205</sup>.



**Figure 23: Production d'interféron de type I lors d'une infection virale.** Les IFNs sont traduits et sécrétés de la cellule infectée de manière autocrine ou paracrine. Lors de la liaison de l'IFN de type I à l'IFNAR1 / IFNAR2 et de l'IFN de type III au récepteur IFNLR1 / IL-10R2, des transductions de signal sont initiées conduisant à la formation du complexe ISGF3 (IRF9 / p-STAT1 / p-STAT2) qui ensuite agit comme un facteur de transcription conduisant l'expression de gènes stimulés par l'interféron (ISG, Interferon stimulated genes). D'après <sup>206</sup>

Les IFN de type I sont des effecteurs antiviraux puissants puisqu'ils contribuent notamment à la maturation des cellules dendritiques (DC), à l'activation des cellules NK, à la production d'anticorps ainsi qu'à la différenciation des lymphocytes T cytotoxique (**Figure 24**) <sup>207</sup>. Ils jouent également un rôle important dans la mise en place de l'immunité adaptative en exerçant une fonction immuno-modulatrice qui permet d'augmenter l'expression des molécules de CMH de classe I et favoriser les machineries des CPA (**Figure 24**) <sup>208</sup>.



**Figure 24: Le rôle des IFN de type I lors d'une l'infection virale au fil du temps.** cDC, cellule dendritique conventionnelle; IFN, interféron; IL, interleukine; ISG, gènes stimulant l'interféron; pDC, cellules dendritiques plasmacytoïdes; PD-L1, ligand de mort programmé 1; PRR, récepteur de reconnaissance de formes. Panneau de gauche adapté de <sup>209</sup>; panneau de droite adapté de <sup>210</sup>

#### b) Induction des IFN de type I par les Entérovirus

Les études visant à explorer les acteurs de la réponse immunitaire innée impliqués dans la reconnaissance des EVs a montré l'importance de TLR3 et MDA5 <sup>14,211,212</sup>. Le rôle de TLR3 a été particulièrement mis en évidence pour les virus coxsackie B3 et B4. Plus récemment, le rôle de MDA5 comme senseur des EV71 a été établi. Différentes études ont montré que certaines formes d'ARN viral possédaient une meilleure affinité pour ce récepteur. Nous avons vu que lorsque l'EV se réplique dans la cellule, l'ARN viral est présent sous plusieurs formes : sous forme répliquative double brin d'environ 7.5 kb et sous forme répliquative intermédiaire simple brin mais possédant quelques segments double brin. Il a été démontré que l'inhibition de la synthèse du brin d'ARN complémentaire et donc la formation de formes répliquatives réprimait l'induction de la réponse immunitaire médiée par les interférons de type 1 ( $\alpha$  et  $\beta$ ) <sup>211</sup>. Cependant lorsque la formation de formes répliquatives est permise mais que la formation de formes intermédiaires est inhibée, la réponse immunitaire médiée par l'interféron de type 1 est plus importante. La forme intermédiaire peut aussi activer MDA5 mais plus modérément. Des expériences de transfection ont montré que les molécules d'ARN simple brin issues des EVs étaient de faibles inducteurs des interférons de type 1 <sup>14,213</sup>. La littérature rapporte des discordances quant à l'importance de RIG-I et MDA5 dans la réponse à l'infection aux EVs. Feng et al. (2014)

ont montré que des souris transgéniques déficientes en MDA5 ne produisaient pas d'IFN de type I en réponse à l'ARN de CVB-3 mais que cela n'était pas vrai pour des souris déficientes en RIG-I, suggérant que MDA5 et non RIG-I est nécessaire à l'induction des IFNs de type 1 <sup>211</sup>. D'autres études avaient trouvé des résultats comparables pour le poliovirus <sup>152,155</sup>. Par ailleurs, la molécule LGP2 qui ne possède pas de domaine CARD et a été initialement identifiée comme un régulateur négatif de la signalisation associée aux RLR, serait importante pour la réponse IFN de type 1 induite par les EVs <sup>214</sup>. Abe et al (2012) ont montré chez la souris déficiente en MAVS qu'il existait toujours une réponse immune médiée par l'IFN de type I après infection par le poliovirus; cela démontre que la voie TLR3/TRIF reste un effecteur majeur de la réponse antivirale <sup>141</sup>. Le rôle précis de TLR3 reste encore à approfondir, les formes répliquatives doubles brins vont l'activer entraînant la transcription des gènes codant pour l'interféron <sup>152,212</sup>.

Bien que la réponse immunitaire innée ne soit pas toujours suffisante pour permettre une clairance complète des EVs, elle représente la première défense avant la mise en place de l'immunité adaptative. Les interférons activent plusieurs gènes conduisant à une protection antivirale. Dans le cas des cellules pancréatiques infectées par les CVB-4, l'interféron- $\alpha$  induit les gènes codant la 2', 5'- oligoadénylate synthétase, la ribonucléase L (RNase) et l'interféron  $\gamma$  induit une protéine kinase (PKR) activée par les ARN viraux double brin conduisant à la protection des cellules contre l'infection <sup>215</sup>. Le rôle des cellules *Natural Killer* (NK) dans cette réponse n'est pas bien exploré ; elles peuvent jouer un rôle non seulement dans la protection mais également dans la médiation de la maladie <sup>216</sup>. Une étude suggère que le système immunitaire inné constitue un déterminant important du tropisme tissulaire ainsi que de la pathogénicité des EVs <sup>217</sup>.

Le CVB-3 est connu pour infecter les cardiomyocytes de façon très localisée et se propager dans le cœur sans développer de réponse immunitaire adaptée. Les souris knock-out pour le récepteur aux IFNs de type 1 sont très sensibles à l'infection par CVB-3, succombant rapidement en quelques jours <sup>218</sup>. L'induction des IFNs de type 1 dans les cardiomyocytes contribue considérablement à l'inhibition de la réplication virale et de la production de particules virales infectieuses dans ce modèle. De plus, dans un modèle murin, l'absence de signalisation IFN de type 1 engendre précocement une élévation des titres viraux, une exacerbation de la myocardite et

d'une augmentation significative de la mortalité. Une mauvaise induction de l'IFN dans les cellules infectées a été signalée dans certaines études et d'autres ont indiqué que les cellules devraient être traitées avec de l'IFN à forte dose pour protéger les cellules contre l'infection <sup>143,219</sup>. En revanche, dans les cellules épithéliales intestinales humaines (HT-29), l'EV 71 induit mieux la production d'IFN que les cellules humaines de rhabdomyosarcome et les cellules HeLa. Ces résultats indiquent que différents tissus et cellules présentent des interactions différentes avec l'EV71.

## **E. ECHAPPEMENT DES ENTEROVIRUS DU GROUPE B A LA REPONSE IMMUNE INNEE**

Les EVs possèdent des propriétés leur permettant d'inhiber les défenses immunitaires de l'hôte. Il existe différentes stratégies chez les entérovirus (**Figure 26 ci-après**). La première concerne la reconnaissance par la cellule hôte des molécules d'ARN étrangers possédant une extrémité 5' triphosphate. Les enzymes cellulaires vont dégrader ces ARN possédant cette extrémité. Le couplage de l'ARN viral à la protéine VPg le rend inaccessible à ces enzymes. De plus l'ARN viral va rester le moins longtemps possible exposé grâce à sa structure IRES qui permet aux ribosomes cellulaires de le traduire rapidement. D'autres stratégies concernent la voie des RLRs et impliquent principalement les protéases virales 2A et 3C.

### **1. Modulation de l'expression génique de la cellule infectée**

L'expression génique peut être modulée à plusieurs niveaux, dès les premières étapes du cycle viral lors de la transcription ou de la traduction. La maturation et l'exportation extra ou intra cellulaire des protéines produites *de novo* et le trafic entre le réticulum et le Golgi peuvent également être impacté. Les gènes exprimés dans la cellule, impliqués dans la réponse immunitaire innée (interférons ou cytokines) peuvent être délétères pour le cycle viral. A l'inverse d'autres gènes n'impacteront pas sur le cycle viral mais sur l'accès et la disposition des métabolites pour la machinerie cellulaire. Au cours de leur cycle viral, les EV-B, notamment le poliovirus et le virus Coxsackie du groupe B, produisent des protéines virales 3Cpro, 2Apro, 2B et 2BC qui vont moduler cette expression génique et avoir des répercussions sur la réponse immunitaire. La protéase 2A des EV71 en plus d'être responsable du clivage de la

polyprotéine virale pour générer les précurseurs de la protéine de capsid 3C et 3D, clive plusieurs protéines cellulaires hôtes, principalement liées à la signalisation des IFN de type I.

La subversion des mécanismes de l'immunité innée permet à de nombreux virus de contourner ou d'inhiber directement la réponse antivirale en ciblant différents interacteurs des voies de signalisation induites suite à la reconnaissance du pathogène viral.

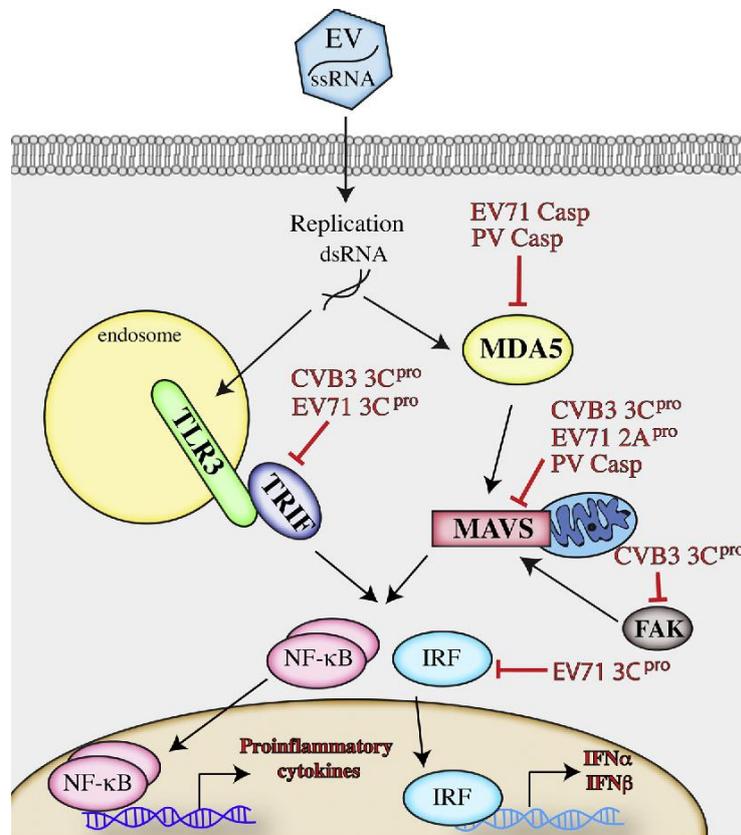
## 2. Interférence des Entérovirus avec la voie des *Toll-like-Receptors*

Les TLRs sont connus pour initier la réponse antivirale par l'activation de voie de signalisation spécifiques du pathogène reconnu, permettant *in fine* l'expression de facteurs immunitaires tels que NF- $\kappa$ B, les IFNs, et autres cytokines ou chimiokines inflammatoires. Ces facteurs et les cellules immunitaires qu'ils activent ont des effets antiviraux *in vitro* et permettent la restriction de la prolifération virale<sup>220,221</sup>. La protéine 3C de l'EV71 est capable d'inactiver plusieurs protéines de la voie de signalisation des TLRs, notamment TRIF, TAK1 et IRF7<sup>222–225</sup>, inhibant la transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 modulés par MMK ou IRF3/7 (**Figure 26**). Cette inhibition a une conséquence importante sur l'immunité innée puisqu'elle va diminuer l'expression de nombreux gènes tels que ceux des facteurs inflammatoires, cytokines et de l'interféron<sup>226,227</sup>. La protéase 2C de EV71 quant à elle interfère avec la voie de signalisation de TLR en inhibant la phosphorylation des intermédiaire IKK $\alpha/\beta$ , inhibant à son tour la transcription de NF- $\kappa$ B et IRF3/7<sup>228,229</sup>. La protéase 2C d'EV71 fonctionne également comme un antagoniste de NF- $\kappa$ B induit par le TNF- $\alpha$ , induisant la sécrétion de nombreuses cytokines (**Figure 26**). L'existence d'un miARN capable d'inhiber TRAF6 est également connu pour EV71 et d'autres virus, réduisant considérablement la réponse immunitaire innée *in vitro*<sup>219,230–233</sup>.

## 3. Interférence des Entérovirus avec les récepteurs RLRs

Pour échapper à la surveillance immunitaire par la voie RIG-I, les entérovirus codent pour une petite protéine qui est la Vpg et qui se lie à l'extrémité 5'-ppp de l'ARN<sup>177</sup>. De plus, les virus induisent la formation d'agrégats de type granule de stress (SG),

appelés antiviraux SG (avSG), dans le cytoplasme pour échapper à la reconnaissance par MDA5<sup>234</sup>.



**Figure 25: Mécanismes et sites d'action des entérovirus inhibant la réponse immunitaire innée médiée par les PRR<sup>212</sup>**

La protéase virale 2A par sa structure, inhibe le regroupement des MAVS qui intervient normalement après activation de RIG-I, il n'y a donc pas de phosphorylation d'IRF-3 et par conséquent pas d'activation de ce dernier<sup>212</sup>. EV71, comme HRV-1 (Human Rhinovirus1), CV-B3 et le poliovirus induisent la dégradation de MDA5<sup>181</sup>. Ce clivage est principalement médié par la protéase 2A (Figure 25)<sup>235</sup>. La protéase virale 3C a la propriété de cliver IRF-7 directement (Figure 25). L'absence de phosphorylation d'IRF-3 conjuguée au clivage d'IRF-7 empêche la transcription des gènes codant pour les interférons de type 1. La molécule adaptatrice MAVS est également ciblée par plusieurs entérovirus incluant HRV-1A, CV-B3 et EV71 par plusieurs mécanismes. Le clivage ferait intervenir la protéase 2A de EV71, la protéase 3C de CV-B3 et, dans le cas du rhinovirus 1, il impliquerait en plus des 2 protéases, la caspase 3 (Figure 25)<sup>235</sup>. De plus, lors de la répllication des EV71, les protéines virales vont induire un

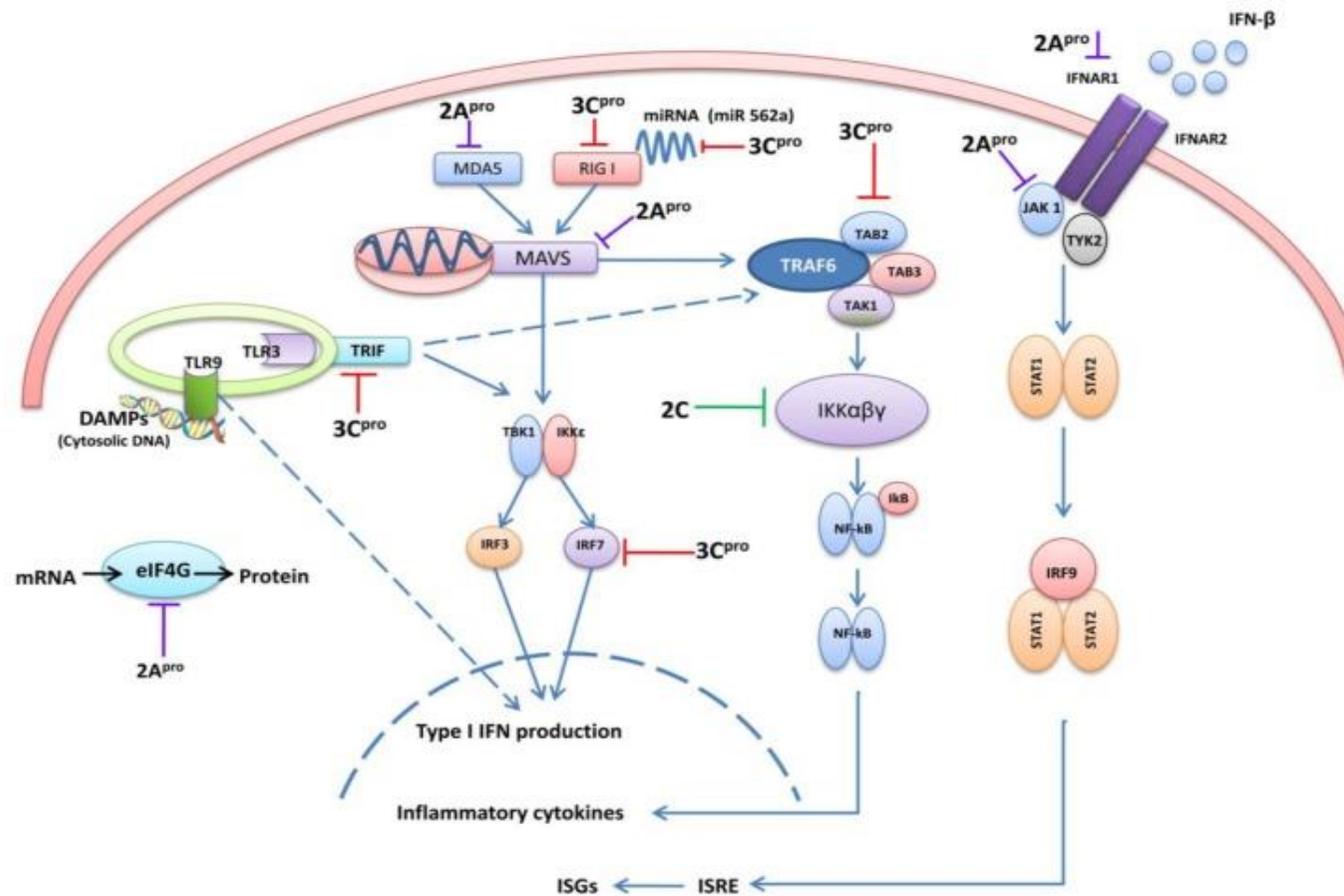
dysfonctionnement des mitochondries et induire un clivage de MAVS. Par conséquent, il pourrait abolir la phosphorylation de l'IRF3, la production d'IFN de type I et augmenter la propagation du virus <sup>236</sup>. Il a également été montré que la protéase 3C de EV71 peut s'associer au récepteur RIG-I empêchant le recrutement de MAVS et donc inhibe l'activation du facteur de transcription IRF3, impactant sur l'expression des ISGs (ISG54, ISG56 et TNF- $\alpha$ ) (**Figure 26**) <sup>49</sup>. Enfin, RIG-1 est également ciblé par plusieurs entérovirus dont CV-B3 et EV71 principalement par le biais de la protéase 3C <sup>180,211</sup>. EV71 inhibe la voie de signalisation associée à RIG-I en empêchant la formation du complexe RIG-I/IPS-1 et la translocation nucléaire d'IRF3 <sup>219</sup>. La signification de cette activité inhibitrice vis-à-vis de RIG-I, une molécule qui ne semble pas reconnaître ces virus, reste à élucider. Le blocage de la voie de signalisation liée à TLR3 par les entérovirus intervient au niveau de TRIF. EV71 et CV-B3 induisent le clivage de TRIF empêchant l'activation du facteur de transcription NF-KB et la production d'IFN de type 1 (**Figure 25**) <sup>212</sup>. Les poliovirus eux, sont capables d'activer la dégradation de TRIF par les caspases <sup>237</sup>. Les EVs sont aussi capables de stopper le métabolisme habituel des cellules et de le détourner à leur avantage. Les protéases 2A et 3C sont capables d'inhiber la traduction des ARNm de la cellule hôte en clivant des facteurs d'initiation de la traduction comme les eIF (eIF4G et eIF4A) et PABP (PolyA-binding protein). Ces derniers se fixent sur l'extrémité 5' des ARNm cellulaires permettant ainsi la fixation des sous-unités ribosomales. Il en résulte donc un blocage de la synthèse des protéines cellulaires et donc de la plupart des molécules impliquées dans la réponse immunitaire ; ce phénomène est nommé shut-off cellulaire. Enfin, les protéines 2BC, 2C et 3A bloquent la sécrétion des protéines cellulaires <sup>238</sup> et provoquent un réarrangement de l'organisation de la membrane cellulaire associant les complexes de réplication virale à cette dernière.

#### 4. Interférence des Entérovirus avec la voie des IFNs

Lors d'une infection virale par entérovirus des cascades de signalisation sont activées par les IFNs pour réguler la réponse immunitaire après fixation des IFNs sur leurs récepteurs spécifiques. Les EVs via leur protéase virale 2A sont capables de moduler la voie de signalisation des IFN de type I en clivant le facteur EIF4G pour diminuer l'expression du récepteur IFNAR1 spécifique des IFN de type I (**Figure 26**) <sup>239</sup>. De plus, la protéine virale 2A bloque la phosphorylation de JAK1, TYK2, STAT1 et

STAT2, intermédiaires de la voie JAK-STAT, entraînant une atténuation de la signalisation immunitaire (**Figure 26**)<sup>207</sup>. Le clivage de la protéine IRF9 par la protéase virale 3C inhibe davantage la signalisation JAK-STAT et affecte éventuellement la transcription des gènes induits par l'IFN pour résister à l'activation de la réponse immunitaire innée<sup>240</sup>. La protéase 3C de l'EV71 s'est également avéré cliver IRF7 et il altère l'induction d'IFN de type I, et la production subséquente d'ISG tels que ISG56 d'une manière dépendante de la dose. Ce clivage se produit indépendamment des caspases, du protéasome, du lysosome et des activités d'autophagie, mais simplement d'un événement protéolytique viral de 3Cpro (**Figure 26**)<sup>42</sup>.

Les interférons ne vont pas agir directement sur les virus en les tuant ou en les inhibant mais les IFNs activent les récepteurs à la surface des cellules pour produire des protéines antivirales afin d'induire une clairance virale<sup>241</sup>. Les infections par les EVs sont capables d'induire une production plus importantes de cytokine inflammatoire telles qu'IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  souvent associé à la sévérité de la maladie et d'activer les cellules immunitaires. De plus, les IFNs sont capables d'activer les cellules immunitaires, y compris les cellules NK, les macrophages et les lymphocytes T, et d'augmenter les défenses de l'hôte en régulant le système immunitaire<sup>242-244</sup>



**Figure 26: Schématisation des stratégies d'évasion des EVs dans les voies de signalisation cellulaire.** 3Cpro, 2Apro et 2C sont principalement impliqués dans la régulation à la baisse de l'IFN de type I, de l'induction des cytokines pro-inflammatoires et des ISG à différents stades. Les molécules de signalisation cellulaire en interaction avec différentes protéines virales sont indiquées à chaque niveau. ( MDA5 : protéine associée à la différenciation du mélanome5 , RIG-I : gène 1 inductible par l'acide rétinolique , MAVS : protéine de signalisation antivirale mitochondriale , TBK1 : kinase de liaison TANK 1 , IRF3 / 7 : facteur réglementaire 3/7 d'interféron , TRIF : Interféron  $\beta$  induisant l'adaptateur contenant un domaine TIR , TLR : récepteurs de type péage , DAMP : modèles moléculaires associés au danger , eIF4G : facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4G , TRAF6 : facteur 6 associé au récepteur TNF , TAK1 : facteur de croissance transformant- $\beta$  kinase activée 1 , TAB2 / 3 : TGF- $\beta$  Kinase activée 2/3 , IFNAR : récepteur d'interféron  $\alpha$  /  $\beta$  , TAK1 : Janus kinase 1 , TYK2 : Tyrosine Kinase 2 , STAT1 / 2 : transducteur de signal et activateur de la transcription 1/2 , ISG : gènes stimulés par l'interféron , ISRE : Interféron - élément de réponse sensible , interférons : interférons

## IV. DECOUVERTE DES FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC DANS LES CELLULES OU TISSUS CARDIAQUES HUMAINS ET PERSISTANCE VIRALE

---

### A. MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION DES FORMES TRONQUEES

Dans les myocardites à EV-B, il a été rapporté la présence de formes tronquées en région 5'NC<sup>10,106,245,246</sup>. Les formes tronquées en 5'NC se comporteraient comme les DVG (*Defective Viral Genome*) déjà décrits chez les autres virus à ARN<sup>247,248</sup>. De même que pour les formes tronquées en région 5'NC, les DVG apparaissent précocement (2 à 3 passages) lors de la réplication virale<sup>249</sup> dans le cardiomyocyte primaire<sup>245</sup> indiquant qu'elles pourraient rapidement être sélectionnées au dépend de la forme virale sauvage complète chez l'Homme<sup>246</sup>. Les DVG sont synthétisées lors de la réplication virale et plus particulièrement par la recombinaison génomique virale. Les DVG ainsi produit dans la cellule hôte vont pouvoir se répliquer avec l'aide de génomes viraux complets et diminuer la capacité de réplication des virus complets. Ces DVG sont sélectionnés lorsque le système immunitaire adaptatif est activé et met en place la clairance du virus sauvage parental. Ces formes virales défectives permettent le développement d'une haute variabilité génétique s'exprimant sous forme de populations de quasi espèces virales évoluant rapidement sous des formes majoritaires par rapport aux formes parentales<sup>250</sup>.

#### 1. Mise en évidence *in vitro* et *in vivo* (modèle murin)

Les premières descriptions de délétions nucléotidiques en région 5'NC du génome des EV-B et plus particulièrement du virus coxsackie B3 (CVB-3) ont été réalisées en 2005 par l'équipe de N.M. Chapman de l'Université du Nebraska. Le passage successif d'un CVB-3 au génome complet dans un modèle de cardiomyocytes murins en culture a permis la constitution d'un virus non-cytolytique sur des cellules immortalisées que sont les HeLa (lignée cancéreuse). L'inoculation de CV-B3 sur un modèle murin C3H/HeJ (Haplotype H2 de type k, de susceptibilité sévère à la myocardite virale<sup>251</sup>) ont permis la détection de CVB-3 non-cytopathique dans le tissu cardiaque<sup>106</sup>. Le séquençage du CVB-3 non-cytopathique dans un système *in vitro* de cardiomyocytes murins et humains primaires puis *in vivo* dans le modèle murin

a révélé la présence de population virales tronquées en région 5'NC de 7 à 49 nucléotides <sup>106,245</sup>. L'inoculation de virions portant un génome tronqué en région 5'NC dans des modèles *in vivo* murins B6.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/SzJ (= C57BL/6 scid, Haplotype H2 de type b, de faible susceptibilité à la myocardite virale <sup>251</sup> ne possédant pas des lymphocytes B et T fonctionnels) et C3H/HeJ a démontré que ces différentes formes étaient capables de se répliquer et de persister dans le tissu cardiaque sur une période de 1 semaine à plus de 5 mois post-inoculation <sup>106</sup>.

## 2. Mise en évidence chez l'homme

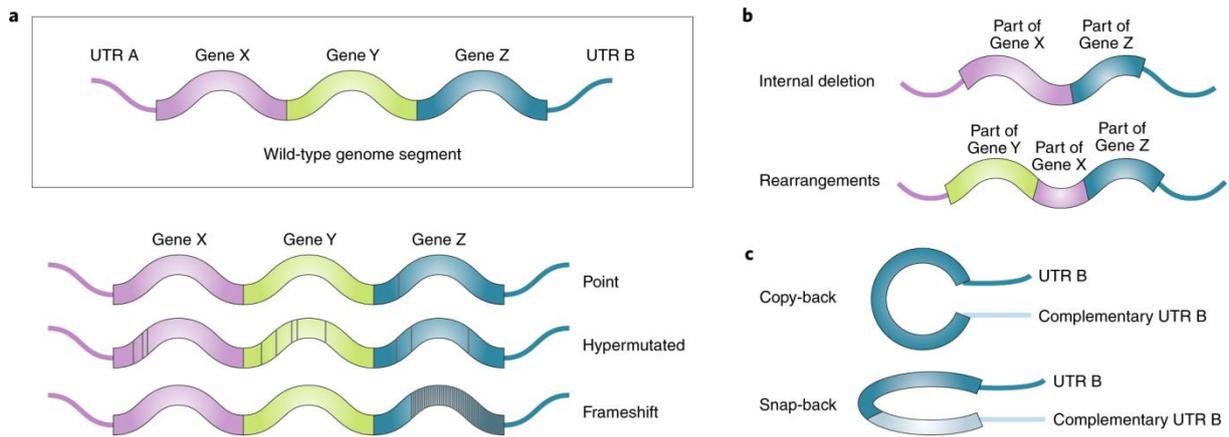
Il a été identifié en 2008 pour la première fois dans un cas humain de myocardite virale fulminante à Coxsackievirus de type B2 (CV-B2), la présence de populations virales tronquées en région 5'non-codante (5'NC) de 22 à 36 nucléotides <sup>10</sup>. Cette dernière étude complétait les travaux montrant la présence de formes tronquées à l'extrémité 5'NC du génome des EVs jusqu'à 49 nucléotides générées à partir d'un virus parental sauvage complet en région 5'NC, dans des modèles murins d'infection cardiaque chronique <sup>10</sup> et de cardiomyocytes humains et murins primaires en culture <sup>106</sup>. En 2016, notre équipe a mis en évidence pour la première fois chez une patiente immunocompétente atteinte d'une myocardite virale à CV-B3 au stade clinique final de CMD des formes virales tronquées en région 5'NC au sein d'une biopsie endomyocardique. Ces différentes populations tronquées en région 5'NC présentent une activité de réplication réduite compatible avec le concept de persistance des Entérovirus <sup>10,106,252</sup>.

### **B. FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC ET GENOMES VIRAUX DEFECTIFS (DVG) CHEZ LES VIRUS A ARN**

La dynamique de réplication des virus à ARN peut être reliée à des taux de fréquence de mutation élevés, la taille de la population et un cycle court de réplication (<12h pour les Entérovirus). Ces différents paramètres impactent la dynamique de réplication virale qui est assurée par la capacité de l'ARN-polymérase-ARN-dépendante virale à réaliser une erreur tous les 10<sup>3</sup> à 10<sup>5</sup> nucléotides copiés. En conséquence, il y a production de populations virales hétérogènes présentant des espèces virales mutantes définissant la notion de quasi-espèces <sup>253,254</sup>. Lors de la réplication du génome viral, le niveau de recombinaison est lié à l'important taux de

mutation et à la faible fidélité de la polymérase virale <sup>255</sup>. Des virus variants présentant des polymérases virales induisent une augmentation du taux d'erreur et un phénotype atténué <sup>254-256</sup>. En 2009, il a été observé pour le virus de la grippe H1N1 que des mutations d'une seule sous-unité de la polymérase virale était capable de générer des génomes défectueux. De plus, pour de nombreux virus à ARN, la réplication à titres élevés entraîne une production très importante de génome viral défectif (DVG, *defective viral genome*) comme il a été observé lors de la réplication du virus Sindbis avec une production de plus de 100 copies de DVG par génome complet produits.

Lorsque la polymérase virale réalise la recombinaison génomique entre deux ARN viraux, un saut de la polymérase virale (**Figure 27**) induit la synthèse d'un génome viral chimérique viable ou défectif (DVG). La majorité de la production des DVGs repose sur le mécanisme de choix de copie. Cependant, bien que minoritaire, la synthèse de génomes défectifs peut survenir suivant un modèle de recombinaison non-réplicatif. Les mutations dans les génomes viraux peuvent conduire à la génération de DVGs qu'il est possible de classer en 4 types principaux <sup>257 258-260</sup>. Ces mutations peuvent être des mutations ponctuelles, des hyper-mutations ou des mutations avec un décalage du cadre de lecture qui modifient la réplication du virus, l'expression des protéines virales et/ou la fonction des protéines virales. Parmi les DVGs on retrouve des formes tronquées issues des délétions nucléotidiques (**Figure 27 b**), des formes copiées et inversées (« *copyback* »)(**Figure 27 c**), des formes en cassées et repliées (« *snapback* ») (**Figure 27 c**), ainsi que des réarrangements génomiques <sup>261-263</sup>.

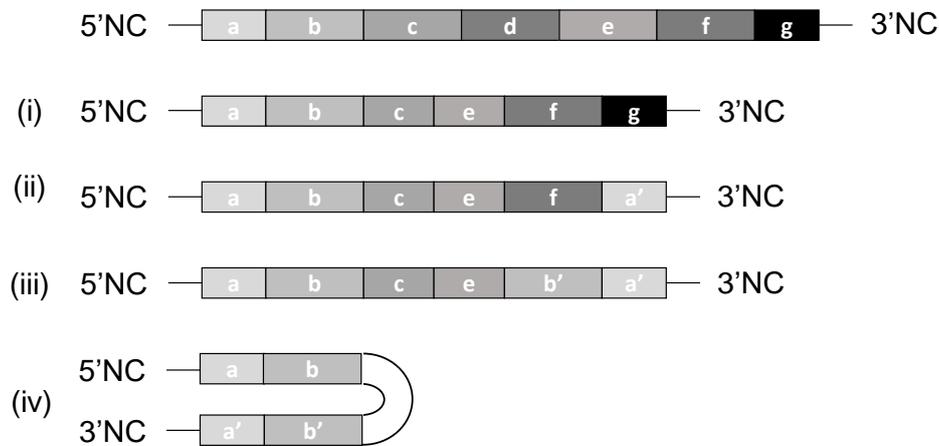


**Figure 27: Différentes classes de DVGs.** a. Génome complet sauvage avec des extrémités A, B et 3 gènes X, Y, Z. b. Les DVGs de type délétion sont générés par la perte d'un gène. Les DVGs de type réarrangement sont générés suite à la réorganisation des gènes au sein du génome. c. Les DVGs « *snap-back* » et « *copy-back* » sont générés lorsqu'une séquence est dupliquée en complémentaire inversé pour créer des structures de type « *panhandle* » pour les DVG *copy-back* ou des structures en épingle à cheveux pour les DVG *snap-back*. D'après <sup>263</sup>.

## 1. Impact sur la diversité génétique

La forme la plus courante de DVG est le résultat d'une perte de la majorité du génome infectieux tout en conservant les extrémités 5'NC et 3'NC d'origines (**Figure 28 i**). La suppression entraîne généralement la perte ou l'altération de l'expression d'un ou de plusieurs gènes. Ces DVG sont générés lorsque la polymérase virale se détache du brin d'origine et se rattache en aval entraînant une délétion génomique plus ou moins importante. La seconde forme de DVG, générés essentiellement chez les virus à ARN négatif, comprend l'extrémité 5'NC d'origine du génome infectieux et une répétition inversée de cette même extrémité en région 3'NC tandis que la séquence entre les deux est conservée (**Figure 28 ii**). Les DVG dits « *copyback* », correspond à un segment du génome infectieux avec des séquences complémentaires de son extrémité 5'NC en région 3'NC qui se produisent lorsque la polymérase virale se détache de la matrice et se rattache au brin nouvellement synthétisé, recopiant l'extrémité 5'NC du génome (**Figure 28**). Enfin, il existe des DVG dits « *snapback* » comprenant une extrémité 5'NC d'origine, mais avec une répétition inversée du reste de la séquence (**Figure 28**). Ces formes présentent une structure dite en « épingle à cheveux » dû à l'interaction des extrémités 5'NC et 3'NC entre-elles. Ces types de génomes ne sont pas transcrits mais peuvent être répliqués par la polymérase virale. Il existe également des DVG mosaïques, pour lesquelles les différentes régions du

génomme du virus infectieux sont organisées différemment ou proviennent d'un autre virus infectieux.



**Figure 28: Génération des différentes classes d'ARN défectueux.** (i) Brin d'ARN viral simple brin parental présentant sept segments génomiques notés de a à g. (ii-iv) Formes DVG tronquées. (ii) DVG présentant une délétion de la majorité du génome infectieux. (iii) DVG présentant une extrémité 5' authentique et une répétition inversée de cette même extrémité en région 3'. (iv) La forme DVG « copyback » formée d'un génome infectieux de taille variable composé d'une extrémité 5' authentique suivi immédiatement d'une répétition inversée d'une partie de la séquence en 5' et de l'extrémité 5'. (vi) La forme DVG « snapback » comprend une seule extrémité 5' authentique mais possède une répétition inversée de presque toute la séquence. D'après <sup>264</sup>.

## 2. Impact sur la recombinaison et les génomes viraux défectifs (DVG)

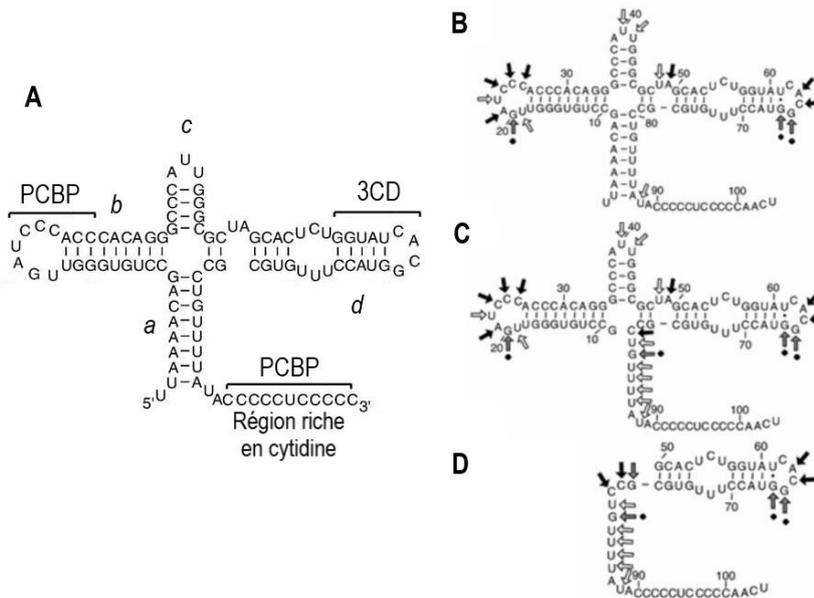
La production des *DVGs* repose sur le saut du complexe de réplication et notamment de la polymérase virale d'un génome ARN matrice vers une deuxième ARN génomique viral : la recombinaison virale est le moteur de la production des *DVG* <sup>254,256,261,265</sup>. Le modèle de recombinaison de M. Vignuzzi *et al.* en 2016, portant sur la réplication du virus Sindbis muté SINV-G et sauvage SINV-WT par la transfection de deux segments d'ARN non réplcatifs seuls : un DVG cloné et un ARN viral « helper » dans des BHK21 a mis en évidence l'augmentation de la production de virus infectieux d'un facteur 10 du SINV-G par rapport au SINV-WT. Ces résultats décrivent la capacité du SINV-G à recombiner par le modèle choix de copie (sans exclure le modèle non-réplcatif) à un taux élevé permettant la synthèse de génomes hétérogènes dont notamment des *DVG* <sup>255</sup>. Le haut taux de recombinaison des virus à ARN contribue fortement au processus d'évolution virale : en effet il favorise une accumulation de mutations avantageuses pour la réplication virale sur un même génome ou induit la restauration fonctionnelle d'un virus à partir de deux génomes

mutés de façon délétère <sup>266</sup>. Ainsi, les virus à ARN qui possèdent des ARN-polymérase-ARN-dépendante de haute activité et donc de faible fidélité présentent un niveau élevé de mutations. La fréquence des mutations génomiques déstabilisant le complexe de réplication induit la formation des DVGs par mécanisme de recombinaison suivant le modèle choix de copie et dans une moindre mesure le modèle non-réplicatif <sup>255,259</sup>.

## C. IMPACT DES FORMES TRONQUEES SUR LA PATHOGENICITE

### 1. Impact sur la réplication génomique

Dans un modèle *in vitro* de cardiomyocytes murins et humains primaires ainsi que dans un modèle *in vivo* murin de myocardite chronique, la réplication du CVB-3 génère des génomes viraux tronqués en région 5'NC. Ces délétions génomiques sont sélectionnées *in vivo* ou *in vitro* au cours de la réplication virale où les intermédiaires de délétions virales en région 5'NC augmentent en taille jusqu'à un maximum de 49 nucléotides <sup>106,245</sup>. Cette limite de délétion de 49 nucléotides en région 5'NC est expliquée par la localisation des sites de fixation des facteurs cellulaires et viraux sur la structure en feuille de trèfle (Tige-boucle I de la région 5'NC ; **Figure 29 A**) qui sont responsables de la réplication virale. Le facteur cellulaire *Poly r(C)-Binding Protein* (PCBP) présente deux sites de fixation sur la feuille de trèfle, un premier site sur la tige-boucle *b* et un deuxième site sur la séquence nucléotidique riche en cytidine. Le facteur viral P3CD se fixe sur la tige-boucle *d*. La délétion des boucles *a*, *b* et *c* qui correspond donc au maximum de nucléotides tronqués (*i.e.* 49 nucléotides ; **Figure 29 D**) laisse intact les structures essentielles fonctionnelles de l'ARN viral. La liaison de PCBP à la région riche en cytidine de la structure en feuille de trèfle (**Figure 29**) permet de stabiliser le complexe de réplication virale et l'inhibition de sa liaison à l'ARN viral induit un arrêt de la synthèse des brins viraux de polarité négative <sup>267,268</sup>.



**Figure 29: Figure : Représentation schématique des sites de fixation des facteurs de la réplication virale sur la structure en feuille de trèfle en région 5'NC.** **A.** La structure en feuille de trèfle en région 5'NC est composée de 4 tige-boucles a, b, c et d. Les facteurs cellulaires et viraux respectivement PCBP et P3CD lient la structure en feuille de trèfle localisée sur l'ARN viral génomique (ARN+) afin de former un complexe ribonucléoprotéique nécessaire à l'initiation de la synthèse des brins d'ARN de polarité négative. **B.** Structure en feuille de trèfle en région 5'NC de forme complète. **C.** Structure en feuille de trèfle tronquée de 10 nucléotides en région 5'NC. **D.** Structure en feuille de trèfle tronquée de 49 nucléotides en région 5'NC. Adapté de [23 et 4].

Du fait de la conservation de la structure de l'IRES, les virus CV-B3 tronqués de 7, 21, 30 et 49 nucléotides en région 5'NC, identifiés par le groupe de N.M. Chapman, ne présentent pas de défaut de traduction par comparaison avec le virus sauvage complet. Cependant, la transfection des formes tronquées en région 5'NC dans un système *in vitro* de cardiomyocytes humains primaires et dans des lignées continues de rat, présente un défaut de synthèse des ARN viraux par rapport aux virus sauvages à ARN complets. La perte des tiges boucles a, b et c lors d'une délétion génomique de 49 nucléotides en extrémité 5' montre la perte d'un des deux sites de fixation pour les protéines PCBP (**Figure 29**). Cette diminution de réplication des virus tronqués en région 5'NC est expliquée non pas par un défaut de liaison des protéines cellulaire PCBP et des protéines virales P3CD à l'ARN viral de polarité positive, mais par une déstabilisation du complexe ribo-nucléoprotéique, expliquant l'instabilité du complexe de réplication et la baisse de la réplication virale. Une concentration plus forte des facteurs cellulaires et viraux est corrélée à la taille de la délétion génomique <sup>269</sup>.

La structure tige-boucle d de la feuille de trèfle (**Figure 29 D**) possède des rôles essentiels dans la fixation du facteur viral 3CD et dans la réplication des brins

génomiques et anti génomiques (respectivement les ARN de polarité + et -). Un CV-B3 tronqué de 77 nucléotides en extrémité 5'NC, ce qui correspond à une délétion des tiges boucles *a*, *b*, *c* et *d*, conserve sa viabilité mais présente une activité de réplication génomique 100 000 fois plus faible qu'un CV-B sauvage <sup>267</sup>. Cette réplication à bas bruit des ARN génomiques viraux tronqués en région 5'NC pourrait s'expliquer par une plus faible affinité pour certains facteurs protéiques cellulaires ou viraux expliquant l'accumulation des ARN viraux négatifs dans le phénomène de persistance des EV-B <sup>106,270</sup>. Ce phénomène est amplifié par la capacité des génomes tronqués en région 5'NC à réaliser l'encapsidation de génomes viraux de polarité négative (brins anti génomiques), notamment grâce à la fixation de la VPg sur l'ARN viral de CV-B3 tronqué en région 5'NC aux extrémités 5'CG et 5'AG <sup>106</sup>, autorisant leur transmission de cellule à cellule. Au final, la description de formes persistantes tronquées en région 5'NC d'EV-B dans le tissu cardiaque dans le cadre de myocardites virales chroniques et de cardiomyopathies dilatées dans des modèles murins et chez l'Homme ont permis de démontrer la présence de génomes d'EV-B tronqués en région 5'NC dans le cadre d'infections virales persistantes <sup>106,245,252</sup>. Dans un second temps, il a été montré dans des modèles *in vitro* et *in vivo* murins la capacité de la P2A à cliver la protéine sarcomérique cardiaque, la dystrophine, phénomène qui permet à lui seul de reproduire expérimentalement chez la souris la CMD <sup>119,271-274</sup>. Les formes virales tronquées en région 5'NC présentant une plus faible capacité de réplication sont générées et sélectionnées lors de la phase précoce de myocardite virale aiguë et peuvent établir une infection chronique de type persistante conduisant à la myocardite chronique puis vers le stade clinique de CMD.

En 2016, l'équipe de M. Vignuzzi a démontré dans un modèle *in vitro* d'infection par comparaison d'un virus Sindbis muté (SINV-G, possédant une polymérase virale de basse fidélité par la mutation C482G) avec un virus Sindbis sauvage (SINV-WT), la capacité de ces deux virus à synthétiser et à accumuler des DVG. A haute multiplicité d'infection, SINV-G présentait une plus forte altération de la cinétique de réplication virale par rapport au SINV-WT. Cette altération a été inversement corrélée avec un fort taux de production de DVG atteignant plus de 100 copies DVG pour 1 génome complet pour le SINV-G. Les DVGs sont des formes virales nécessitant les protéines d'un virus complet pour se répliquer, s'empaqueter et se transmettre. L'expression constitutive de DVG après transfection de cellules BHK-21 a montré une

diminution de 2 à 3 fois du titre viral (copies de génome par ml) par rapport au contrôle sans DVG démontrant ainsi la capacité de ces génomes tronqués à interférer sur les mécanismes de réplication du génome viral complet <sup>265</sup>.

## 2. Production de protéines virales

Il a également été montré que ces formes tronquées du CVB3 ont été capables d'entraîner des perturbations de la fonctionnalité cellulaire par action des protéases virales (P2A, 3CD) sur des structures membranaires ou de la matrice extracellulaire, mais aussi le clivage de facteur de transcription cellulaire comme eIF4G ou l'induction de la voie apoptotique mitochondriale via les protéines de capside virale (VP1-4) <sup>9</sup>. Par ailleurs l'association entre le virus tronqué et le virus complet augmente significativement la production de protéines virales matures et donc leur impact sur la fonctionnalité cellulaire. De plus des protéines virales comme la P2A ou la 3CD produites en plus grande quantité mais à des taux inférieurs à ceux du virus sauvage pourrait avoir un rôle majeur sur la modulation de la reconnaissance de l'infection persistante par le système immunitaire et en particulier en inactivant partiellement la réponse innée antivirale et ceci via le clivage des RLRs (senseurs de l'immunité intracellulaires) de type MDA5 et MAVS <sup>275</sup>.

### **D. DECOUVERTE DES FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC DANS LES CELLULES OU TISSUS CARDIAQUES HUMAINS ET PERSISTANCE VIRALE**

La persistance des Entérovirus impose des modifications du mode et de la dynamique de réplication. Afin de ne pas détruire la cellule hôte par les conséquences directes de la réplication virale ou afin d'empêcher son élimination par le système immunitaire inné ou adaptatif, le virus doit diminuer le niveau d'expression de son génome ARN et de ses protéines virales. L'infection persistante en s'établissant notamment par la sélection de virus variants possédant une pathogénicité réduite est produite par la nature de quasi-espèces des entérovirus à produire un fort taux de mutations <sup>276</sup>. De plus, la réplication des DVGs se réalise au dépend du virus parental et diminue de ce fait le pouvoir pathogène de ce dernier <sup>277-279</sup>.

Au cours de la phase active de réplication virale au sein de la cellule hôte, les entérovirus développent des variations dans leurs génomes à ARN au travers de

mécanismes tels que des mutations ponctuelles dans les régions codantes et non codantes, des recombinaisons génétiques au niveau du génome entier ou de délétions génomiques (DVG). Ces différentes formes virales sont sélectionnées au dépend des formes parentales et induisent l'infection virale persistante caractérisée par le maintien de l'activité de réplication génomique, de synthèse des protéines virales et la faible production de particules infectieuses.

\_\_\_\_\_ Les formes virales persistantes mises en évidence au sein d'une biopsie endomyocardique d'une patiente atteinte d'une cardiomyopathie dilatée (CMD) à CVB-3 étaient caractérisées par un mélange de formes majoritairement tronquées en région 5'NC (99,1%) associées à une minorité de virus complet (0,9%)<sup>246</sup>. Ce mélange de formes virales présentait une basse charge virale ( $8 \times 10^2$  copies/ $\mu$ g d'acide nucléiques extraits) et un bas ratio d'ARN positif sur ARN négatif (4,8) compatibles avec le concept de la persistance des entérovirus<sup>246</sup>. Cette publication présente le premier cas humain de pathologie cardiaque associée à des populations tronquées et complètes d'entérovirus du groupe B faiblement répliquatives et définies comme persistantes et qui pourraient contribuer à la pathogenèse de cas de CMD classées comme inexplicables.

#### **E. IMPACT DES FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC ET DES GENOMES VIRAUX DEFECTIFS SUR LE PHENOTYPE CLINIQUE ET LA SEVERITE DES PATHOLOGIES**

La persistance des virus à ARN est généralement pathogène et associée au développement et à l'exacerbation des maladies chroniques. De nombreux virus à ARN connus pour être à l'origine d'infections aiguës sont également décrits comme persistant chez l'homme et souvent associés à des maladies chroniques, bien qu'aucun effet causal n'ait été démontré. C'est le cas du RSV impliqués dans l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive, le virus Zika, le virus Chikungunya associé à des arthralgies chroniques et le virus Ebola<sup>280-284</sup>. En 2015 Tracy et al. ont montré que des délétions de l'extrémité 5'NC du génome des virus Coxsackie du groupe B permettaient au virus de persister dans le pancréas de souris<sup>285</sup>. Pour les entérovirus il a été montré que les formes de CV-B3 tronquées seules pourraient produire des protéines virales matures telles que la P2A suffisante pour induire *in vivo*

et *in vitro* le passage à la chronicité avec une CMD à l'origine de clivage de la dystrophine <sup>286</sup>.

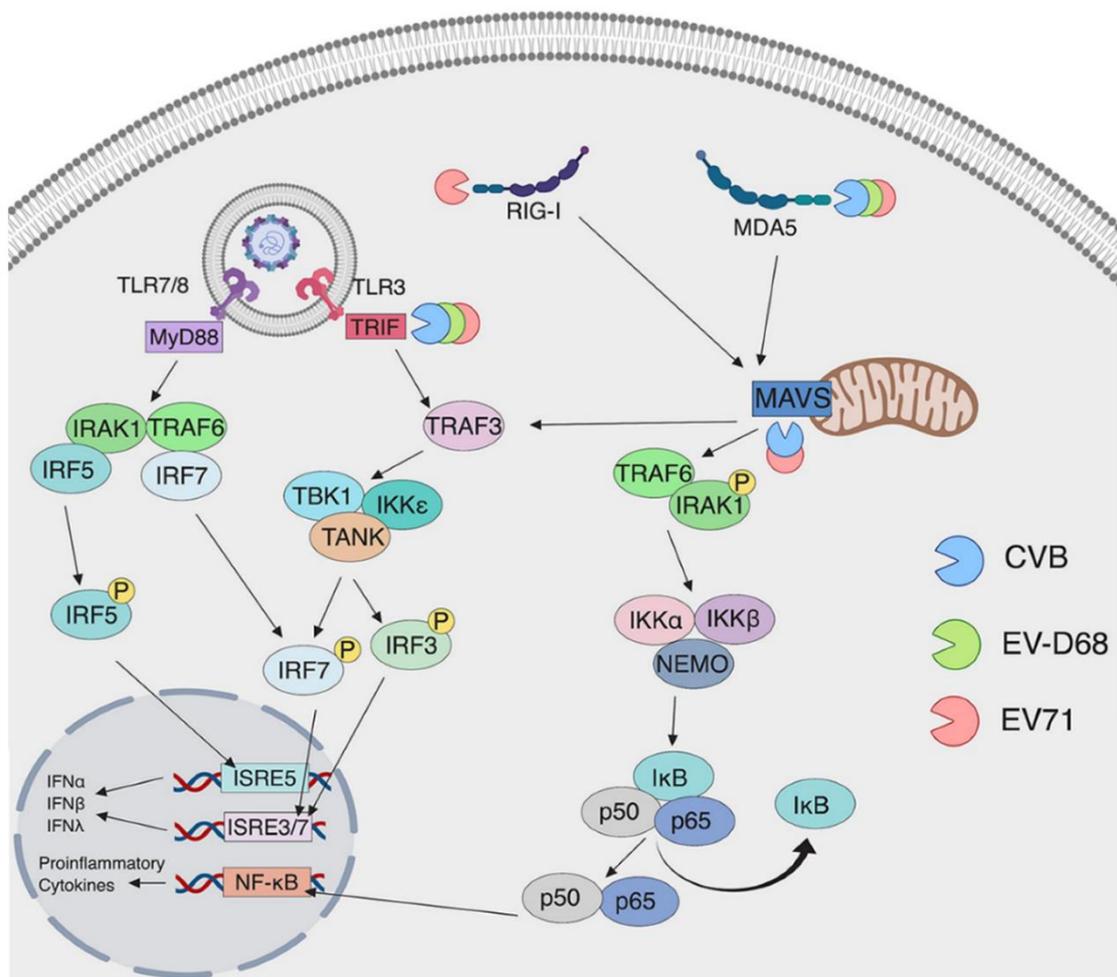
\_\_\_\_\_ Il a été démontré pour plusieurs virus que la quantité de DVG joue un rôle majeur dans la détermination de la gravité de la maladie. Notamment pour le virus de la grippe et le virus de l'Hépatite B, il a été montré que la proportion des génomes défectueux était plus élevée dans les cas grave ou mortel de la maladie que dans des cas plus légers. En 2017, Falcon et *al.* ont montré en modèles *in vitro* et *in vivo* murins puis chez l'homme, que la sévérité de l'infection par le virus influenza était corrélée à de faibles taux de production de DVGs. Une forme atténuée du virus influenza isolée d'un patient infecté présentant des symptômes bénins montrent une production de DVGs 10 fois supérieure à celle d'une forme hautement pathogène isolée d'un cas fatal. Une mutation dans la sous-unité PA de la polymérase du virus de la grippe a été corrélée avec la réduction de l'accumulation de DVG et l'aggravation de la pathogénicité. A contrario, les DVGs étant connus comme de puissants inducteurs de l'immunité, il pourrait engendrer une tempête cytokinique et être responsable de la gravité de la maladie, mécanismes encore méconnus qu'il faudrait explorer.

\_\_\_\_\_ Cependant, il est connu que l'accumulation à haut niveau de DVG dans les cultures cellulaires et chez la souris induit une forte expression de la voie des IFN de type I. L'analyse comparative de patients infectés par le virus influenza en fonction de la sévérité du tableau clinique montre l'importance des niveaux des DVGs. Les patients atteints de pathologies sévères sont infectés par des virus Influenza présentant une production de faibles taux de DVGs <sup>287</sup>. Dans les infections cardiaques à EV, les fortes proportions <sup>246</sup> des virus tronqués jusqu'à 49 nucléotides en région 5'NC pourraient moduler la capacité de réplication virale mais aussi les niveaux de production des interférons de type I, impactant ainsi sur la sévérité clinique de la maladie dans la phase de myocardite aiguë (forme classique vs. fulminante) et favorisant le basculement de la phase aiguë vers la phase chronique de l'infection.

## F. IMPACT DES FORMES TRONQUEES EN REGION 5'NC SUR LA RECONNAISSANCE PAR LES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE

### 1. Génomes viraux défectifs et reconnaissance par le système immunitaire

En 2014, l'équipe de F.J.M. van Kuppeveld a démontré que la reconnaissance et l'activation de RIG-I par le génome du CVB-3 étaient induites par la fixation du récepteur cytosolique cellulaire à la structure en feuille de trèfle de l'ARN possédant un groupement 5'triphosphate à l'extrémité 5'NC <sup>15</sup>. Ces données *in vitro* obtenues dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) supportent l'hypothèse du rôle de la structure en feuille de trèfle en tant que ligand dans la reconnaissance du CV-B3 par RIG-I et MDA5. De plus, au cours de l'évolution de la myocardite virale, on note l'acquisition de formes tronquées jusqu'à 50 nucléotides en région 5'NC des entérovirus dans le tissu cardiaque du malade. Cette délétion d'une partie de la structure en feuille de trèfle pourrait induire un changement de conformation ainsi qu'une perte de la reconnaissance de RIG-I vis-à-vis du virus et permettrait le maintien du génome viral dans la cellule hôte infectée sans activation du système immunitaire inné. Le maintien de la réplication virale des formes tronquées serait associé à une activité de synthèse à bas bruit protéases 2A et 3C capables d'induire un clivage partiel du récepteur MDA5 et des MAVS. En effet, la traduction du génome viral permet la traduction de la polyprotéine virale qui, après autocatalyse des protéases endogènes, induit la libération des protéines virales dont les deux protéases d'importance : la protéase 2A et 3C. Il a été montré récemment une stratégie commune des entérovirus (CVB-3, poliovirus et EV-71) à induire les clivages du récepteur MDA-5 et de son intermédiaire d'activation MAVS par la P2A (**Figure 30**). Les CV-B clivent par la P3C les intermédiaires de la voie de synthèse des IFN de type I (**Figure 30**) <sup>6</sup>. De même, la protéine P3C des EVs clivent le récepteur RIG-I <sup>180,235,288</sup>. L'inactivation des molécules clefs de la reconnaissance du système immunitaire inné permet la suppression directe de l'activation des voies de signalisation antivirales et induit la promotion de la réplication ainsi que l'échappement du virus à la clairance virale.



**Figure 30: Stratégies d'évasion des entérovirus à la voie de signalisation des IFNs médiée par les TLRs et RLRs.** Les entérovirus ciblent les protéines de signalisation immunitaire innée par clivage par les protéases virales 2A et 3C. Les cibles des protéases CVB (bleu), EV-D68 (vert) et EV71 (rouge) sont représentées. Les trois protéases virales ciblent MDA5 et la protéine adaptatrice TLR, TRIF, comme mécanismes pour arrêter la signalisation immunitaire innée antivirale dans les cellules infectées.

## 2. Génomes viraux défectifs et vaccination

En raison de leur activité immunostimulante, les DVGs ont été testés en tant qu'antiviraux et adjuvants <sup>264,289</sup>. Il a été montré dans de multiples travaux *in vivo* qu'en tant qu'antiviraux les DVGs interfèrent avec la réplication du virus infectieux, retardant sa propagation et permettant à l'hôte de générer une réponse antivirale <sup>264,290,291</sup>. De plus, les vaccins complétés par des DVGs administrés par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intranasale montrent une production plus importante d'anticorps et une meilleure protection contre les virus <sup>292,293</sup>. On retrouve également les DVGs dans les vaccins vivants atténués contre les virus de la polio, de la rougeole et de la grippe

<sup>294-298</sup> qui auraient un impact sur leur activité protectrice. Cette protection peut être stimulée par des motifs immunostimulants portés par les structures secondaires des DVGs <sup>293,299</sup>.

\_\_\_\_\_ On ignore si ces DVGs pourraient jouer le rôle d'adjuvants aux vaccins en raison de leur potentiel immuno-stimulateur connu et / ou si elles pourraient même jouer un rôle dans la vaccination en favorisant la présentation des antigènes. Cependant pour le Virus Sendai (SeV), les DVGs sous forme de « copyback » obtenues sont connus pour augmenter la capacité de présentation de l'antigène des cellules dendritiques humaines et de souris, induisant ensuite l'activation des cellules T et la mise en place de la réponse immunitaire <sup>293</sup>. Notamment, la possibilité que les DVGs agissent comme des leurres immunisés pour renverser les mécanismes de surveillance de l'hôte n'a pas encore été explorée. Les DVGs étant connus comme d'aussi puissant inducteur de l'immunité innée que les formes sauvages complètes, les DVGs pourraient entrer en compétition avec le virus complet pour lier des anticorps produits par l'hôte et les neutraliser, ce qui permettrait au virus complet d'échapper au système immunitaire.

Récemment, la notion de particules interférentes thérapeutiques (*Therapeutic interfering particles*, TIPS) équivalent à des DVGs synthétiquement obtenus a été proposée. Ces TIPS. Pour se répliquer ces TIPS ont besoin d'un virus « helper » complet infectieux présent dans l'organisme, ce qui leur confère un avantage à être utilisés en vaccination <sup>300,301</sup>.

# **HYPOTHESES**

Des formes virales tronquées à l'extrémité 5' de la région non-codante (5'NC) de l'ARN génomique ont été décrites au de la myocardite aigue humaine et murine induite par les EV-B <sup>11,302-304</sup>. De manière intéressante, notre groupe a montré que ces formes virales tronquées en région 5'NC apparaissent précocement lors de la réplication virale <sup>268</sup> dans les cardiomyocytes primaires humains <sup>303</sup>. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les formes virales tronquées pourraient être rapidement générées et sélectionnées au dépend des formes virales complètes dans les tissus cardiaques lors des myocardites aiguës.

Des travaux de notre laboratoire en collaboration avec le groupe de Bert Semler (Irvine, USA) ont montrés que les délétions génétiques de l'extrémité 5'NC du génome de CV-B3 avaient des répercussions sur la structure du domaine I (feuille de trèfle) de l'ARN génomique en diminuant les niveaux de réplication génomique <sup>13</sup>. De plus, il a été démontré que le domaine I de l'ARN de CV-B3 contenant une structure 5'triphosphate était suffisant pour induire une réponse IFN de type 1 ainsi que de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par la voie de signalisation RIG-I <sup>15</sup>. On sait également que les formes répliquatives complètes d'ARN double brin de CV-B3 sont reconnues par MDA5, déclenchant une réponse IFN de type 1 significative dans des cellules humaines et murines en culture <sup>14</sup>. Les délétions dans la région 5'NC des populations d'EV-B pourraient modifier les éléments structurels secondaires de l'ARN reconnus par les senseurs cytoplasmiques de l'immunité innée, tels que RIG-I ou MDA5 (RLRs, *RIG-I-Like Receptors*), entraînant une régulation négative de l'induction des IFN de type 1 et la promotion d'un échappement immunitaire inné antiviral <sup>305</sup>. À ce jour, l'impact des formes tronquées d'EV-B sur le profil de la réponse inflammatoire et plus particulièrement sur l'induction de l'IFN de type 1 dans les tissus cibles reste à étudier lors des infections aiguës à EV-B. Le décryptage des mécanismes moléculaires conduisant à l'émergence précoce des formes virales tronquées et à leur impact sur la modulation de l'immunité innée dans les infections aiguës à EV-B pourrait permettre le développement d'immunothérapies cibles afin de rétablir une réponse immunitaire innée antivirale efficace et potentiellement d'obtenir une clairance virale des cellules cibles.

Notre hypothèse de travail repose sur le concept qu'au cours de la phase aigüe de l'infection par les EV-B différents profils de mélange de formes génomiques

complètes et tronquées réguleraient l'induction de la voie des interférons de type I par un effet de modulation de la reconnaissance de ces ARN viraux par les RLRs (MDA5 et/ou RIG-I). Ainsi nos investigations scientifiques réalisées au cours de ces travaux de thèse ont eu pour objectif de mieux comprendre le rôle des ARN génomiques des EV-B complets et tronqués en région 5'NC dans la modulation de l'induction de la voie des interférons de type I dans des échantillons cliniques, dans un modèle *in vivo* chez la souris et *in vitro* dans des cellules cardiaques humaines en culture.

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**

Notre travail de recherche clinique et expérimentale a reposé sur trois axes majeurs visant respectivement à :

**Axe 1 : Analyser l'impact des formes ARN complètes et tronquées en 5'NC des EV-B sur la réponse IFN de type 1 dans des cas de myocardites pédiatriques et dans des cardiomyocytes humains en culture.**

Ce premier axe a impliqué l'étude des extraits d'ARN total de tissus cardiaques et/ou de sang périphérique d'enfants atteints de myocardite aiguë à EV-B (banque rétrospective de prélèvements cliniques issus du CHU de Reims et des CNR des Entérovirus de Lyon et Clermont-Ferrand).

Nous avons caractérisé et quantifié les proportions des formes ARN d'Entérovirus (EV) présentant des délétions nucléotidiques en région 5'NC grâce à une méthode standardisée et rapide d'amplification des extrémités d'ADNc (RACE-PCR) suivi d'une micro-électrophorèse. Après avoir détecté et quantifié ces formes virales, nous avons étudié leur impact sur l'activité de réplication génomique et les niveaux de sécrétion d'interféron de type I dans le myocarde et le sang périphérique. Afin de confirmer *in vitro* l'effet immunomodulateur des formes tronquées en région 5'NC sur l'induction de la réponse interféron de type I, nous avons transfecté des cellules HeLa229 ou des cellules cardiaques primaires humaines (HCM) par des ARN synthétiques de CV-B3/28 présentant des délétions de taille variable dans la région 5'NC.

**Axe 2 : Déterminer la dynamique d'apparition des populations de virus Coxsackie-B3 tronquées dans le domaine I de l'ARN génomique et leur impact sur l'activation de la voie des interférons de type I au cours de la myocardite aiguë chez la souris DBA2/J.**

Au cours de la phase aiguë de l'infection cardiaque à CV-B3 dans les tissus cardiaques de souris DBA2/J, notre travail a consisté à : (i) observer l'évolution des lésions histologiques dans les tissus cibles au cours de l'infection ; (ii) étudier la dynamique d'apparition des formes tronquées de CV-B3 naturellement produit au cours de l'infection par RACE-PCR ; (iii) évaluer l'impact de ces formes tronquées sur la réponse inflammatoire de type Th-1 (IL10-MCP1 et TNF- $\alpha$ ) et en particulier la production des interférons de type I (IFN- $\beta$ ) ; (iv) de confirmer dans des cellules

cardiaques primaires humaines (HCM) l'effet régulateur des formes tronquées en région 5'NC sur l'induction de la voie des interférons de type I.

**Axe 3 : Identifier les mécanismes moléculaires de reconnaissance des formes ARN complètes et tronquées en région 5'NC de CV-B3 par les senseurs de l'immunité innée (MDA5, RIG-I) dans les cardiomyocytes humains en culture.**

Dans le sang périphérique de patients présentant une virémie secondaire à EV-B (sepsis pédiatrique avec ou sans myocardite cliniquement prouvée; banque rétrospective de prélèvements cliniques issus du CHU de Reims), nous avons identifié par une technique de RACE-PCR suivi d'une micro-électrophorèse des mélanges d'ARN d'EV-B complets ou tronqués en région 5'NC de leur génome et nous avons étudié leur impact sur la modulation de la réponse interférons de type I. Au niveau clinique, deux profils de proportions de populations d'ARN complets et tronqués capables d'induire des niveaux de transcrits d'interférons- $\beta$  variables ont été identifiés. Dans des cellules cardiaques primaires humaines (HCM), ces profils de populations complètes et tronquées ont été reproduites par transfection d'ARN synthétiques de la souche cardiotrope humaine CV-B3/28. Les caractéristiques moléculaires de ces ARN génomiques viraux endo-cellulaires ont été déterminés (mono-caténaire, bi-caténaire, phosphorylation, polarité, % d'encapsidation). La génération d'ARN complets et tronqués pour les différentes structures successives du domaine I de l'ARN de CV-B3 a permis d'identifier les structures nucléotidiques ou motifs nucléotidiques du domaine I (feuille de trèfle) responsables de la modulation de l'activation des voies interférons de type I. L'utilisation de lignées cellulaires sur-exprimant chacun des RLRs (RIG-I, MDA5 ou LGP2) et de lignées STING 37 knock-down pour chacun des RLRs, nous a permis de caractériser le ou les RLRs responsables de la reconnaissance de ces formes virales et d'identifier par quels mécanismes les profils des formes ARN de CVB3 modulent la production des interférons de type I dans la cellule cible.

**DEUXIEME PARTIE :**  
**TRAVAUX ORIGINAUX**

## **V. Article n°1 : Les populations majoritaires d'Entérovirus du groupe B (EV-B) tronquées à l'extrémité 5'terminale modulent la réponse IFN de type I chez les patients atteints de myocardite aiguë et in vitro dans les cardiomyocytes humains en culture.**

---

Des formes ARN des Entérovirus du groupe B (EV-B) tronquées à leur extrémité 5' Non-Codante (5'NC) de 22 à 36 nucléotides ont été mises en évidence pour la première fois par un approche de RT-PCR en escalier dans les biopsies endomyocardiques d'un patient japonais décédé d'une myocardite fulminante<sup>306</sup>. Des formes ARN similaires ont été décrites pour le virus Coxsackie B3 *in vitro* dans des cardiomyocytes primaires humains (HCM, *Human Cardiac Myocytes*) et *in vivo* dans le myocarde de souris présentant une myocardite aiguë ou chronique<sup>106,303</sup>. Entre 2016 et 2019, les travaux de notre groupe de recherche (Cardiovir,EA-4684) ont pu démontré par une approche de séquençage haut débit (NGS) que les populations virales persistantes (charge virale faible et ratios ARN(+)/ARN(-)<5) dans les explants cardiaques de patients souffrant d'une cardiomyopathie chronique (CMD), étaient composées d'une majorité de formes virales tronquées en 5'NC (95%) associée à une proportion minoritaire (<5%) de formes virales complètes<sup>307</sup>. L'ensemble de nos résultats associés à ceux de Chapman et al. suggèrent que des populations d'EV-B tronquées en 5'NC peuvent être générées et sélectionnées rapidement dans les tissus cardiaques au cours de la myocardite virale et que l'émergence de ces populations à plus faible niveau de réplication peut expliquer comment le virus persiste dans les tissus cardiaques permettant à partir de la phase aiguë le développement de la myocardite chronique et de la phase clinique de CMD.

Au cours de la première phase de notre travail de thèse, nous avons voulu préciser la dynamique d'apparition des formes d'Entérovirus (EV) présentant des délétions nucléotidiques en région 5'NC au cours de la myocardite aiguë. Pour réaliser cet objectif scientifique, nous avons développé et validé une technique d'amplification rapide des terminaisons de l'ADN complémentaire (RACE-PCR) suivi d'une micro-électrophorèse permettant d'identifier et de quantifier les proportions des formes d'EV présentant un ARN complet ou tronqué en région 5'NC dans des extraits d'ARN de sang périphérique EDTA ou de biopsies cardiaques. Des prélèvements plasmatiques (n=6) et cardiaques (n=4), archivés à -80°C entre 2014 et 2017 au sein des laboratoires

du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Reims et des Centres Nationaux de Référence des Entérovirus et Parechovirus de Lyon et Clermont-Ferrand, ont été rétrospectivement sélectionnés chez des patients pédiatriques atteints de myocardite aiguë. Dans ce manuscrit original (accepté en Mai 2020 dans la revue « **Scientific Reports** »), nous avons identifié par RACE-PCR suivie d'une micro-électrophorèse que les niveaux moyens d'EV-B majoritaires tronqués de 37 à 50 nt (90%) étaient statistiquement plus élevés que ceux des EV-B minoritaires tronqués de 15 à 36 nt (3%) ( $P < 10^{-3}$ ) et ceux des EV-B présentant une extrémité 5'NC complète (7%) ( $P < 10^{-3}$ ) dans des échantillons cardiaques et/ou plasmatiques de patients pédiatriques atteints d'une myocardite aiguë. De plus, nous avons évalué que les proportions des populations minoritaires identifiées étaient positivement corrélées avec les niveaux de réplication d'ARN génomique d'EV-B ( $R^2=0,865$ ,  $P=0,007$ ) et les niveaux de transcrits d'IFN- $\beta$  ( $R^2=0,735$ ,  $P=0,014$ ) dans les échantillons de sang plasmatique. Ensuite, pour confirmer les effets immunomodulateurs de ces formes tronquées en région 5'NC, des ARN synthétiques de CVB3/28 avec des séquences complètes ou tronquées en région 5'NC ont été générés *in vitro* et transfectés dans des cellules HeLa229 et des cardiomyocytes humains. Cette approche *in vitro* a montré que le domaine I (feuille de trèfle) de l'ARN génomique EV-B possède des éléments structuraux secondaires immunomodulateurs essentiels, responsables de l'induction de la voie des IFN- $\beta$  dans les cellules cibles humaines.

En conclusion, l'utilisation de la technique de RACE-PCR nous a permis d'identifier la présence de populations majoritaires de CVB ou d'Echovirus (EV-B) tronquées (délétions de 36 à 50 nt) associées à des formes ARN minoritaires tronquées de 8 à 36 nt et complètes dans des prélèvements plasmatiques ou des tissus cardiaques de patients pédiatriques atteints de myocardite aiguë. Nous avons ensuite mis en évidence que les proportions de populations mineures tronquées de 15 à 36 nt ou complètes en région 5'NC étaient positivement corrélées avec les niveaux d'ARN EV-B détectés et les niveaux de transcrits d'IFN- $\beta$  dans les échantillons de sang plasmatique. Ces résultats suggèrent que la détection quantitative des populations d'EV-B tronquées en 5'NC pourrait être un potentiel biomarqueur sanguin périphérique des capacités de réplication génomique et donc de sévérité clinique des myocardites aiguës EV-B, contribuant ainsi à diminuer la fréquence des biopsies endomyocardiques chez les patients pédiatriques. Enfin, cette approche moléculaire de RACE-PCR nous a permis d'étudier l'impact des formes virales ARN tronquées en

5'NC dans la régulation des interactions virus-cellule cible au cours des infections humaines aiguës par les EV-B. Nos résultats mettent en évidence l'émergence de populations majoritaires d'EV-B tronquées en région 5'NC dont les structures secondaires du domaine I de l'ARN génomique d'EV-B altérées, sont responsables de la modulation de la réponse IFN- $\beta$ . Le rôle des formes d'ARN tronqués en 5'NC d'EV-B sur les mécanismes immunitaires innés et sur les réponses inflammatoires dans le tissu cardiaque qui a pu être mis en exergue dans ces travaux suggèrent le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la modulation de la voie IFN de type 1 induit dans infections cardiaques aiguës à EV-B.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

## Scientific Reports

### Full title:

**Major 5' Terminally Deleted Enterovirus Populations Modulate Type I IFN Response in Acute Myocarditis Patients and in Human Cultured Cardiomyocytes**

**Running title: Interferon Modulation by 5' Terminally Deleted EVB-RNA forms**

M. Glenet<sup>1</sup>, Y. N'Guyen<sup>1,2</sup>, A. Mirand<sup>3,4,5</sup>, C. Henquell<sup>3,4,5</sup>, A-L. Lebreil<sup>1</sup>, F. Berri<sup>1</sup>, F. Bani-Sadr<sup>2</sup>, B. Lina<sup>6,7,8</sup>, I. Schuffenecker<sup>6,7,8</sup>, L. Andreoletti\*<sup>1,2</sup> and the French Enterovirus Myocarditis Study Group (FEMSG).

<sup>1</sup>University of Reims Champagne-Ardenne and EA4684 Cardiovir research laboratory, Reims, France

<sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Reims, France

<sup>3</sup>National Reference Center of Enterovirus and Parechovirus, Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup>University of Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

<sup>5</sup>Centre Hospitalier Universitaire Clermont-Ferrand, France

<sup>6</sup>National Reference Center of Enterovirus and Parechovirus, Lyon, France

<sup>7</sup>Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>8</sup>University of Lyon, Lyon, France

**Correspondence\*:** Laurent Andreoletti, Laboratoire de Virologie médicale et moléculaire and EA-4684 CardioVir, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex, France. Tel: (+33) 3 26 78 77 02; Fax: (+33) 3 26 78 41 34; E-mail: [landreoletti@chu-reims.fr](mailto:landreoletti@chu-reims.fr)

**Total word count:** 5439 words

31 **Abstract: (200 words)**

32

33 Major 5' terminally deleted (5'TD) group-B enterovirus (EV-B) populations were identified in  
34 heart biopsies of patients with fulminant myocarditis or dilated cardiomyopathy suggesting that  
35 these 5'TD forms are key drivers of host-cell interaction in EV cardiac infections. To date, early  
36 emergence of EV-B 5'TD forms and its impact on type 1 IFN response during acute myocarditis  
37 remains unknown. Using quantitative RACE-PCR assay, we identified major EV-B 5'TD RNA  
38 populations in plasma or heart samples of acute myocarditis cases. Deletions identified within  
39 the 5' non-coding region of EV-B populations only affected secondary-structural elements of  
40 genomic RNA domain I and were distinguished in two major groups based on the extent of  
41 RNA structural deletions. Proportions of these two respective EV-B 5'TD population groups  
42 were positively or negatively correlated with IFN- $\beta$  levels in plasma samples of myocarditis  
43 patients. Transfection of synthetic CVB3/28 RNAs harboring various 5'terminal full-length or  
44 deleted sequences into human cultured cardiomyocytes demonstrated that viral genomic RNA  
45 domain I possessed essential immunomodulatory secondary-structural elements responsible for  
46 IFN- $\beta$  pathway induction. Overall, our results highlight the early emergence of major EVB-TD  
47 populations which deletions affecting secondary-structures of RNA domain I can modulate  
48 innate immune sensing mechanisms in cardiomyocytes of patients with acute myocarditis.

49

50 **Key words:** Myocarditis, group-B enterovirus, 5' terminally deleted viral populations, RACE-  
51 PCR, micro-electrophoresis assay, type I interferon.

52 **Introduction**

53

54 Group-B Enteroviruses (EV-B) belong to the *Picornaviridae* family and are recognized as  
55 major causes of aseptic meningitis, upper or lower respiratory tract infections and acute  
56 myocarditis cases diagnosed in neonates, infants and young adults <sup>1,2</sup>. Between 10-20% of acute  
57 myocarditis cases will evolve into chronic myocarditis as well as dilated cardiomyopathy  
58 (DCM, prevalence = 7 cases / 100,000, second leading cause of heart transplantation worldwide  
59 after ischemic heart disease) <sup>1</sup>.

60 EV-B RNA genome is approximately 7,400 nucleotides (nt) in length and is flanked at the 5'  
61 end by a highly conserved non-coding region (5'NCR) that is crucial for the initiation of the  
62 viral replication and translation activities <sup>3</sup>. A study in 2008 of heart tissue from a patient who  
63 died of fulminant myocarditis demonstrated the presence of a group B Coxsackie virus type 2  
64 (CVB-2) population with partial deletions at the 5' terminus and proceeding inward <sup>4</sup>. Similar  
65 findings had been described following CVB-3 replication in cell cultures and in mice <sup>5,6</sup>. Bouin  
66 *et al.* (2016) identified EV-B populations characterized by 5'NCR RNA deletions ranging from  
67 15 to 48 nt either alone or associated with low proportions of intact 5'NCR termini in heart  
68 biopsies collected from a living woman suffering from unexplained DCM <sup>7</sup>. These results were  
69 subsequently extended by NGS (Next Generation Sequencing) investigation of explanted heart  
70 tissues from a cohort of unexplained DCM adult patients <sup>8</sup>. Together, these findings suggested  
71 that EV-B populations with 5' terminally deleted (5'TD) genomes can be generated and  
72 selected in heart tissues during the early acute viral myocarditis. The emergence of these low  
73 replicative TD populations offer a valid explanation on how EV-B can persist in hearts long  
74 after the acute infection during the chronic myocarditis of the clinical phase of DCM.

75 Natural deletions within the 5'NCR of EV-B RNA populations can affect functional secondary-  
76 structural elements of the RNA domain I (cloverleaf, CL) <sup>9-11</sup> altering formation or stability of  
77 viral replication complexes and consequently decreasing genomic replicative capacities of

78 5'TD viral RNA forms <sup>12-14</sup>. Moreover, it was evidenced that the 5'triphosphorylated cloverleaf  
79 structure of CVB3 RNA is sufficient to induce a type 1 IFN response by the RIG-I signalling  
80 pathway <sup>10</sup>. In addition, it was reported that complete double-strand RNA replicative forms of  
81 EV-B were recognized by MDA5 triggering a significant type 1 IFN response in cultured  
82 human or mice cells <sup>9</sup>. Early natural deletions into the 5'NCR of EV-B populations could  
83 modify the RNA secondary-structural elements recognized by cytoplasmic immune sensors,  
84 such as RIG-I or MDA5 (RLRs, RIG-I-Like Receptors), resulting in a modulation of type 1  
85 IFN pathway induction in human cells, a potential way to overcome antiviral immune innate  
86 host response leading to persistent infection in target tissues <sup>15</sup>. To date, the impact of 5'TD  
87 viral RNA forms on viral replication activities and type 1 IFN response levels remain to be fully  
88 investigated in EV-B induced acute myocarditis.

89

90 In the present report, using a quantitative RACE-PCR system we identified major EV-B 5'TD  
91 RNA populations associated with minor full-length (FL) viruses in peripheral blood or heart  
92 tissue samples of acute myocarditis pediatric patients. Identified deletion groups within the  
93 5'NCR of major EV-B RNA populations affected only secondary-structural elements of the  
94 RNA domain I (cloverleaf). Using correlation analyses, we assessed the impact of EV-B 5'TD  
95 population proportions on viral genomic replication activities and type 1 IFN (interferon beta,  
96 IFN- $\beta$ ) secretion levels in peripheral blood samples of myocarditis patients. Subsequently,  
97 transfection of synthetic CVB3/28 RNAs harboring various 5'terminal full-length or deleted  
98 sequences were generated *in vitro* and their impact on type 1 IFN pathway induction was  
99 assessed on HeLa229 and human primary cardiomyocytes (HCM) cultures.

100

101 **RESULTS**

102 **Identification of group B Enteroviruses in heart tissues or peripheral blood samples of**  
 103 **acute myocarditis patients**

104

105 **Table 1: Demographic, clinical and virological data in study acute myocarditis patients**

Demographic data	
Number of patients with myocarditis/Number of samples (n=)	6/10
Median age (days)	21.6 [3.6 - 90]
Sex (males/female)	5/1
Clinical data	
Blood samples (%)	6 (60)
Hearts samples (autoptic) (%)	4 (40)
Median delay between beginning of symptoms and time of hospitalization (days)	3.58 [1-7]
Virological data	
Median EV RNA level detection (blood samples)(genomes copies/ml)	$1.09 \times 10^5$ [ $1.82 \times 10^3 - 2.98 \times 10^7$ ]
Median EV RNA level detection (heart samples) (genomes copies/ $\mu$ g)	$4.5 \times 10^6$ [ $3.97 \times 10^4 - 9.65 \times 10^6$ ]
Proportion of full-length form (FL) (%)	7 [0 - 18.0]
Proportion of 15 to 36 nt TD forms (%)	3 [0 - 15.0]
Proportion of full-length and 15 to 36 nt TD forms (%)	10 [0 - 18.0]
Proportion of 37 to 50 nt TD forms (%)	90 [66.97 - 94.95]

106

107 Footnotes: Values are expressed as median; EV, enterovirus.

108

109 Among the study patients [5 males/1 female; median age 21.6 days (3.6 - 90 days)] median time  
 110 delay between symptoms and sample collection was 3.58 days (1 - 7 days) (**Table 1**). An EV-  
 111 genus specific real-time quantitative reverse transcription PCR protocol demonstrated an  
 112 endomyocardial standardized median viral genome load value of  $4.50 \times 10^6$  copies [range:  
 113  $3.97 \times 10^4 - 9.65 \times 10^6$ ] per microgram of total extracted nucleic acids (**Figure 1A**) and a 10-fold  
 114 lower median EV viral load value of  $1.09 \times 10^5$  copies [range:  $1.82 \times 10^3 - 2.98 \times 10^7$ ] per mL of  
 115 plasma in study acute myocarditis patients (**Figure 1A**). Phylogenetic analysis and genotypic  
 116 identification were based on the partial viral protein 1 (VP1) nucleotide sequence using reverse  
 117 transcription PCR of the VP1 into 10 peripheral blood or biopsy heart samples taken from 6  
 118 patients (**Figure 1B**). All strains of clinical samples were classified as group B Enterovirus  
 119 (EV-B) strain and we identified five different species in study patients. As displayed in **Figure**

120 **1B**, four patients were clustered with group B coxsackieviruses (CVB-3, CVB-4 and CVB-5)  
121 and two patients grouped into Echovirus 9 and 11 clusters.

122

123 **Quantitative detection of EV-B 5'terminally deleted RNA populations using a RACE-**  
124 **PCR system**

125 To detect and quantify EV-B RNA of FL as well as 5'TD forms in cardiac tissue samples and  
126 peripheral blood samples from acute myocarditis patients, we used a sensitive and specific rapid  
127 amplification of cDNA ends (RACE) PCR followed by micro-electrophoresis assay  
128 (**Supplementary Figure S2**) <sup>7</sup>. Our RACE-PCR assay allowed to size viral cDNA with  
129 5'deletions ranging from 35 to 137 bp with an accuracy of 10% established by manufacturer,  
130 even in cases of mixed RNA forms (**Figure 2A, 2C and 2E**). Concentrations of synthetic FL,  
131 50 nt deleted (TD50) viral or mixed FL and TD50 cDNA forms diluted in plasmatic or cardiac  
132 cDNA appeared to be positively correlated with estimated cDNA copies per  $\mu$ l of PCR product  
133 using our RACE-PCR strategy ( $R^2=0.976$ ,  $P<10^{-3}$  for FL form;  $R^2=0.964$ ,  $P=0.003$  for TD50  
134 form and  $R^2=0.921$ ,  $P<10^{-3}$  for FL and TD50 mix) (**Figures 2B, 2D and 2F**).

135

136 Using our RACE-PCR system, we assessed the concentrations and the respective proportions  
137 of EV-B FL and 5'TD forms in heart tissue and peripheral blood samples taken from patients  
138 with acute myocarditis (**Figure 3 and Supplementary Figure S3**). Concentrations of FL and  
139 various 5'TD forms appeared to be statistically well-correlated with estimated cDNA copies  
140 per  $\mu$ l of PCR product validating our quantitative RACE-PCR approach ( $R^2=0.999$ ,  $P<10^{-3}$ )  
141 (**Figure 3A**). We identified various 5'TD viral forms with deletion ranging from 5 to 45 nt  
142 which proportion levels are displayed in **Figure 3B**. Viral populations deleted from less than 8  
143 nt were considered as full-length (FL). Various identified deletions at the terminus of the  
144 5'NCR of viral RNA affect the secondary structure, resulting in the loss of stem "a", stem-loop  
145 "b", "c" and part of stem-loop "d" of the cloverleaf structure (**Figures 3B and 3C**). Taking into

6

146 account the secondary structure of the EV-B RNA cloverleaf structure, these 5' TD viral  
147 populations can be distinguished as three subgroups based on the extent of RNA deletions: (i)  
148 TDs ranging from 0 to 8 nt resulting in the loss of stem "a", (ii) TDs ranging from 15 to 36 nt  
149 resulting in the loss of stem "a", stem-loop "b," and (iii) TDs ranging from 37 to 50 nt resulting  
150 in the loss of stem "a", stem-loop "b", "c" and part of stem-loop "d" in the 5' cloverleaf RNA  
151 structure.

152 Finally, our molecular approach identified major EV-B populations characterized by 5'TD  
153 population ranging between 37-50 nt (90%) in length which was associated with minor  
154 proportions of 5'TD 15-36 nt (3%) and FL RNA forms (7%) (**Figure 3D**).

155

#### 156 **Impact of EV-B 5'terminally deleted populations on viral genomic replication activities** 157 **in plasma of acute myocarditis patients**

158 To assess whether 5'TD RNA populations levels could modulate viral genomic replication  
159 activities, 5'TD viral RNA form groups proportions were compared with total EV viral RNA  
160 loads measured in plasma samples (**Figure 4**). A positive correlation was observed between  
161 associated 5'TD 15-36 nt and FL RNA forms proportions and EV total RNA levels ( $R^2=0.865$ ;  
162  $P=0.007$ ) (**Figure 4C**). Interestingly, the proportions of FL or 15-36 nt deleted EV-B RNA  
163 forms alone appeared to be positively correlated with EV total RNA levels (FL:  $R^2=0.710$ ;  
164  $P=0.035$  and 15-36 nt deleted forms:  $R^2=0.883$ ;  $P=0.005$ ) (**Figures 4A and 4B**). By contrast, a  
165 negative correlation was observed between EV total RNA levels and the proportion of 37-50 nt  
166 deleted EV-B RNA forms ( $R^2=0.865$ ,  $P=0.007$ ) (**Figure 4D**). Moreover, a negative correlation  
167 was observed between EV total RNA levels and minor FL population associated to 37-50 nt  
168 deleted EV-B RNA forms proportions ( $R^2=0.897$ ,  $P=0.004$ ) (**Figure 4E**). These findings  
169 suggested the impact of the extent of RNA deletions in the 5'cloverleaf RNA structure on the  
170 viral genomic replication levels in peripheral blood of acute myocarditis patients.

171  
172 **Impact of EV-B 5'terminally deleted populations on type 1 IFN levels in plasma of acute**  
173 **myocarditis patients**

174 Using correlation analyses, we investigated the impact of identified EV-B 5'TD population  
175 proportions on type 1 IFN mRNA levels in peripheral blood of acute myocarditis patients  
176 (**Figure 5**). Interestingly IFN- $\beta$  mRNA levels appeared significantly higher to IFN- $\alpha$  mRNA in  
177 study patients (**Figure 5A**). No correlation was observed between relative fold change of IFN-  
178  $\alpha$  and proportions of FL, 5'TD 15-36 nt, 5'TD 37-50 nt, FL associated with 5'TD 15-36 nt or  
179 FL associated with 5'TD 37-50 nt populations (**Supplementary Figure S4**). No correlation  
180 was observed between FL form proportion alone and IFN- $\beta$  levels (**Figure 5B**). However, a  
181 positive correlation was observed between 5'TD 15-36 nt deleted EV-B RNA forms proportions  
182 alone and IFN- $\beta$  levels ( $R^2=0.880$ ;  $P=0.006$ ) (**Figure 5C**). Also a positive correlation was  
183 observed between minor FL population associated with 5'TD 15-36 nt deleted EV-B RNA  
184 forms proportions and IFN- $\beta$  levels ( $R^2=0.829$ ;  $P=0.012$ ) (**Figure 5D**). By contrast, a negative  
185 correlation was observed between 37-50 nt deleted EV-B RNA forms alone or associated with  
186 FL forms proportion and IFN- $\beta$  levels ( $R^2=0.829$ ,  $P=0.012$  and  $R^2=0.880$ ,  $P=0.006$ ,  
187 respectively) (**Figures 5E and 5F**). These results suggest that populations and proportions of  
188 5' terminal deletions of EV-B RNA forms modulate IFN- $\beta$  response in acute myocarditis  
189 patients.

190

191 **Type 1 IFN pathway induction in HeLa229 or human cultured cardiomyocytes**

192 Since EV-B RNA 5' terminal deletions forms were associated with a modulation of IFN- $\beta$   
193 response in acute myocarditis patients, a key biological issue was to identify 5'NCR secondary-  
194 structural elements capable of regulating type 1 IFN activation pathway in human target cells  
195 (**Figure 6**). Various CVB3/28 RNA sequences including full-length (FL) genomic RNA,  
196 cloverleaf (CL), 5'non-coding region (5'NCR) and FL viral RNA forms without cloverleaf

197 (FL $\Delta$ CL) were cloned and *in vitro* transcribed. These synthetic CVB3/28 RNA forms were  
198 positive single strand RNA structures without 5'tri-phosphate groups and were therefore  
199 unable to induce a non-specific type 1 IFN response via RIG-I pathway activation in target cells  
200 <sup>10</sup> (**Figure 6A**). To investigate the modulatory effect of type 1 IFN activation pathway by EV-  
201 B 5'TD viral RNA structures in human cells, transfection of our synthetic viral RNA forms was  
202 performed in HeLa229 and then in cultured primary cardiac cells (HCM). (**Figure 6B, 6C, 6D**  
203 **and 6E**).

204 Interestingly, HCM transfection of synthetic CVB3/28 CL and 5'NCR RNA forms induced  
205 significantly higher levels of IFN- $\beta$  mRNA than those observed with FL RNA forms at 8 hours'  
206 post-transfection ( $P<0.01$ ) (**Figure 6C**). By contrast, IFN- $\beta$  mRNA levels appeared to be  
207 significantly lower after FL $\Delta$ CL transfection in HeLa229 and cardiac cells than those observed  
208 following transfection of CL, 5'NCR and FL viral RNA forms ( $P<0.01$ ) (**Figure 6B and 6D**).

209 IFN- $\beta$  cytokine levels was quantified in the supernatant of HeLa229 and HCM cells transfected  
210 by the same synthetic RNA forms and confirmed significant variations of IFN- $\beta$  mRNA levels  
211 following FL $\Delta$ CL viral RNAs transfection (**Figure 6C and 6E**). Overall, our findings indicated  
212 that EV-B 5'NCR genomic RNA domain I (cloverleaf) contained sequences or secondary  
213 structural elements responsible for IFN- $\beta$  pathway induction in HeLa229 and HCM.

214

215 **DISCUSSION**

216 Major 5'terminally deleted (5'TD) Group-B enterovirus (EV-B) populations were previously  
217 identified in heart biopsies of patients with fulminant myocarditis or dilated cardiomyopathy  
218 suggesting that these 5'TD forms are key drivers of host-cell interaction in EV cardiac  
219 infections. In the present report, two major 5'TD RNA population groups were identified in  
220 peripheral blood or heart tissue samples of EV-B acute myocarditis cases and their respective  
221 proportions appeared to be positively or negatively correlated with type 1 IFN levels. To  
222 confirm immunomodulatory effects of these 5'TD RNA forms on the type 1 IFN pathway  
223 induction, synthetic CVB3/28 RNAs harboring various 5'terminal full-length (FL) or deleted  
224 genomic sequences were transfected into HeLa229 or human primary cardiomyocytes cultures.  
225 This *in vitro* approach displayed that EV-B genomic RNA domain I (Cloverleaf (CL))  
226 possessed essential immunomodulatory secondary-structural elements responsible for IFN- $\beta$   
227 pathway induction in human target cells.

228

229 We identified major EV-B 5'TD RNA forms in rare peripheral blood or heart tissue samples  
230 taken from pediatric patients hospitalized for an EV-related acute myocarditis (**Table 1 and**  
231 **Figure 1**). Our 5'TD RNA populations identification is consistent with, and extend the results  
232 published previously for, a fulminant human myocarditis <sup>16</sup> and in a recent cohort of EV-  
233 induced DCM (**Figure 2**) <sup>7</sup>. In the present study focusing on acute myocarditis cases, 15 to 36nt  
234 deleted EV-B RNA forms proportions and FL RNA forms were quantified in higher proportions  
235 than those recently reported by our group in EV-induced DCM cases. These discrepancies could  
236 partly explain the different levels of EV replication observed in heart tissues between EV-  
237 related acute myocarditis and EV-related persistent cardiac infection demonstrated in chronic  
238 myocarditis and DCM cases.

239 Interestingly, taking into account the secondary structure of the EV-B RNA cloverleaf (RNA  
240 domain I), 5'TD viral populations were distinguished as two major groups (8-36 nt and 37-50  
241 nt EV-B 5'TD forms) based on the extent of RNA deletions (**Figure 3**). Proportions of 5'TD  
242 15-36nt forms alone or associated with FL were positively correlated with EV-B viral load  
243 levels in peripheral blood samples, whereas 5'TD 37-50 nt forms alone or associated with FL  
244 genomic RNA were negatively correlated with peripheral EV-B RNA levels in the same  
245 peripheral plasma blood samples (**Figure 4**). Such terminal 5'NCR deletions are known to  
246 affect functional secondary-structure of viral EV-B RNA domain I<sup>9,10,17</sup>, corresponding to a  
247 cloverleaf structure, decreasing the ability of cellular factors binding to the viral RNA  
248 replication complex and resulting in lower viral RNA replication levels in CVB3-infected  
249 cardiomyocytes<sup>17</sup>. The major 5'TD 37-50 nt forms loosened a part of the 5'translated region  
250 cloverleaf structure, but the viral RNA polymerase (3CD) binding site remains intact (**Figures**  
251 **3C and 3D**). Finally, these deletions resulted in the loss of stem "a", stem-loop "b," stem-loop  
252 "c," and part of stem-loop "d" in the 5' cloverleaf RNA structure (**Figure 3C**), consistent with  
253 results published previously for a fulminant human myocarditis<sup>18</sup> and in a recently published  
254 case of EV-induced DCM<sup>8</sup>. These RNA deletions disrupt the host protein PCBP binding site  
255 located in stem-loop "b"<sup>19</sup> and decrease the viral RNA replication activities and finally resulted  
256 in a negative correlation observed between the proportion of 5'TD 37-50 nt deleted viral RNA  
257 populations and total viral RNA load values (**Figure 4D**). Since proportions of 37-50 nt EV-B  
258 5'TD populations were negatively correlated with the total EV RNA levels in peripheral blood,  
259 we hypothesized that these viral forms were low-level replicating viruses which sustained  
260 genomic replication activities would result from molecular cooperation mechanisms with other  
261 viral RNA populations. Full-length or 8-36 nt EV-B 5'TD viruses could play the role of helper  
262 virus by providing, in trans or through genomic recombination events, the elements necessary  
263 for replication of 37-50 nt EV-B 5'TD RNA forms<sup>20,21</sup>. These 5'TD viral forms associated with

264 8-36 nt 5'TD or FL viruses could reproduce *in vivo* a mode of viral replication that was reported  
265 to occur in cell culture via defective interfering (DI) particles <sup>22</sup>. Further experiments based on  
266 co-transfection of synthetic CVB3/28 FL and various 5'TD RNA forms in human cultured  
267 cardiac cells are needed to explore this hypothesis.

268

269 We hypothesized that levels of minor FL and 5'TD 15-36 nt forms could positively increase  
270 EV genomic RNA replication activities and total EV viral loads in heart tissue, therefore  
271 modulating the activation pathways of inflammatory response and resulting in more severe  
272 cardiac histological injuries in acute myocarditis cases <sup>8,17</sup>. Interestingly, in only one study  
273 subject, the distribution of median levels of 5'TD viral forms appeared not to be significantly  
274 different between peripheral blood and heart compartments in an intra-patient comparative  
275 analysis, suggesting that peripheral blood circulating viral RNA population levels detected in  
276 the plasma blood were representative of those detected in cardiac tissues (**Supplementary**  
277 **Figure S1**). It is intriguing to consider that the quantitative detection of various minor EV-B  
278 RNA populations could be a potential peripheral blood biomarker of acute myocarditis severity  
279 (**Figure 3**). Being able to quantify various mixtures of EV-B FL or 5'TD forms in plasmatic or  
280 cardiac samples RNA would allowed the evaluation of 5'TD viral forms dynamics apparition  
281 and the measurement of viral RNA levels to simplify an assessment of EV-induced acute  
282 myocarditis with normal, mild or severe cardiac histological injuries, thus helping to diminish  
283 the frequency of performing endomyocardial biopsy (EMB) in patients. Further experiments  
284 using NGS approaches of the EV-B 5'NCR RNA detected genome, will confirm the presence  
285 of major 5'TD detected in EV-B RNA forms in heart tissue or peripheral blood samples of acute  
286 myocarditis cases in pediatric and adult patients. Moreover, such NGS approaches integrated  
287 in prospective and longitudinal clinical studies would allow investigation of the potential

288 positive predictive value of minor FL or 5'TD proportion forms in the development of severe  
289 acute or fulminant myocarditis cases.

290

291 We showed for the first time that 8-36 nt and 37-50 nt EV-B 5'TD population's proportions  
292 could modulate IFN- $\beta$  levels in peripheral blood samples of acute myocarditis patients. We  
293 observed that these two groups of 5'terminally RNA deletions differentially affected  
294 secondary-structures of RNA domain I which could result in a differential qualitative binding  
295 of EV-B 5'TD RNA sequences to the RLRs (RIG-I or MDA5) acting as major innate immune  
296 sensors during EV-B acute infections <sup>23</sup>. In an effort to understand the link between RNA  
297 domain I structure and IFN- $\beta$  pathway induction, transfection of synthetic CVB3/28 RNAs  
298 harboring various 5'terminal FL or deleted genomic sequences was assessed into HeLa229 and  
299 then in cultured human primary cardiomyocytes. Our original results demonstrated that viral  
300 genomic RNA domain I contained essential immunomodulatory secondary-structural elements  
301 responsible for IFN- $\beta$  pathway induction (**Figure 6**). To date, the exact secondary RNA domain  
302 I structures recognized by RLRs (RIG-I or MDA5) possibly in a LGP2-dependant manner,  
303 remains unknown. We are currently addressing this question by generating synthetic FL forms  
304 specifically deleted within the various stem-loops of EV-B RNA domain I and using  
305 overexpressing and knock-out HEK293T cells for RLRs <sup>23</sup>. Modulation of RLRs activation by  
306 5'terminal RNA structures of EV-B 5'TD viruses could impair type 1 IFN pathway activation,  
307 thus regulating IFN- $\beta$  and interferon-stimulated gene (ISG) transcription and translation levels  
308 in infected cells, a potential way to overcome antiviral immune innate host response.

309

310 In summary, our results highlight the early emergence of major EV-B 5'TD populations which  
311 deletions affecting secondary-structures of RNA domain I can modulate innate immune sensing  
312 mechanisms in cardiomyocytes of patients with acute myocarditis. These results provide new

15

313 insights into the role of EV-B 5'UTR RNA forms on innate immune mechanisms and  
314 inflammatory responses in heart tissue and should stimulate the research for the development  
315 of new therapeutic strategies based on modulation of type 1 IFN pathway in EV-B induced  
316 acute cardiac infections.

317

## 318 **METHODS**

319

320 **Patient selection.** Peripheral blood plasma (n=6) and cardiac tissue samples (n=4) were  
321 collected between 2014 and 2017 and stored in three biobanks (-80°C) [Enterovirus National  
322 Reference Centers Hospices civils de Lyon; Clermont-Ferrand University Hospital Center;  
323 Hôpital Européen Georges Pompidou Paris University Hospital (AP-HP, PARIS, France)] were  
324 selected because: (i) they were collected from patients demonstrating a final recorded clinical  
325 diagnosis of acute myocarditis established according to ESC guidelines by physicians from the  
326 French myocarditis study group<sup>24</sup>; (ii) they were positive for EV RNA genome detection; (iii)  
327 they were negative for the molecular detection of HHV1-HHV6, PVB19 and adenovirus  
328 genomes and for the detection of a bacterial sepsis.

329 The institutional review committee (Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France)  
330 approved the study, and informed consent was obtained from the patients or subjects' families  
331 at the time of hospitalization or necropsy. Our investigations conformed to the principles  
332 outlined in the Declaration of Helsinki for use of human tissue or subjects.

333

## 334 **Cultured cells**

335 HeLa229 cells were grown in minimum essential media (MEM) supplemented by 1%  
336 Penicillin-streptomycin (PS) (Gibco, France), 1% L-Glutamine and 10% Fetal Bovin Serum  
337 (FBS) (ThermoFisher, France). Human primary CardioMyocytes (HCM, ScienCell Research

338 Laboratories) were cultured in cardiac myocyte medium (CMM) supplemented by 1%  
339 Penicillin-streptomycin, 1% Cardiac Myocyte Growth Supplement (CMGS) and 5% FBS  
340 (ScienCell Research Laboratories) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cardiac myocyte cell cultures were  
341 passaged twice a week and the cells were cultured between passages 3 to 9.

342

343 **Detection and quantification of viral RNA.** Reverse transcription was carried out using  
344 Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). Detection of full-length  
345 RNA copy number in heart tissues and peripheral blood samples was quantitated by RT-qPCR  
346 using a StepOne plus real time PCR system (ThermoFisher Scientific). Detection of viral RNA  
347 was performed using iQ Supermix (BioRad) and 200nM NC1M primer (nt 456-474) (Fwd: 5'-  
348 CCCTGAATGCGGCTAATCC), 200nM E2 primer (nt 582-601) (Rev: 5'-  
349 ATTGTCACCATAAGCAGCCA) and 100nM S-Ent probe (nt 539-566) (Fwd: 5'- FAM-  
350 AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-BHQ1) (**Supplementary Table S1**). RT  
351 products were unhybridized at 94°C for 5min, and then cDNAs were amplified during 45 cycles  
352 as follows: 94°C for 15sec, 63°C for 1min, and 68°C for 30sec. To validate detection and  
353 quantitation of EV sequences in clinical samples, serial dilutions of transcripts of wild-type  
354 CVB3 (CVB3/28 strain) clones were used as standard for qPCR.

355

356 **Phylogenetic analysis.** Molecular phylogeny of Enterovirus strains detected in clinical samples  
357 was based on the VP1 region nucleotide sequence. Sequences were aligned using Clustal W  
358 version 1.81 ([www.clustal.org/](http://www.clustal.org/)). Evolutionary distances were calculated using the Kimura 2-  
359 parameter method. Trees were constructed using the mixed-linear method (MLM) as  
360 implemented in MEGA 6 software<sup>25</sup>. Bootstrap values from 1,000 replicates are shown at the  
361 nodes. Scale bar indicates number of nucleotide substitutions per site.

362

363 **RT-semi nested PCR.** To perform genotyping, viral RNA was extracted from clinical samples  
364 (blood samples and heart tissues) using QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen). cDNAs were  
365 generated using Superscript II kit (Invitrogen, ThermoFisher) with random hexamers primers  
366 (Roche, Life science) in a 20µL reaction mix according the manufacturer's protocol. cDNAs  
367 were then amplified by a two-step semi-nested PCR. Briefly, reverse transcribed products were  
368 amplified by KAPA Taq polymerase kit consisting of 1X KAPA TaqA buffer, 200µM dNTPs,  
369 400nM of forward primer 222 (Fwd: 5'-CICCIGCIGGIAYRWACAT), 400nM of reverse  
370 primer 224 (Rev: 5'-GCIATGYTIGGIACICAYRT) for the first PCR and 400nM AN88 (Fwd:  
371 5'-TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT), 400nM AN89 for the second PCR (Rev:  
372 5'-CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG), 1U KAPA Taq polymerase in a mix of 25µL  
373 with a cycling process composed of one cycle for 1min at 95°C, 40 cycles of 30s at 95°C, 30s  
374 at 55°C, 2min at 72°C, finishing in a cycle of 2min at 72°C. Amplicons were analyzed on  
375 Ethidium-bromide stained 1.5% agarose gels in TBE Buffer (Tris-borate-EDTA 10X, Thermo  
376 Scientific, ThermoFisher) and DNA bands were gel-purified using QIAquick Gel Extraction  
377 Kit (Qiagen) according the manufacturer's instructions. Purified PCR products were sequenced  
378 by Genewiz (Takeley Sanger Sequencing Laboratory, United Kingdom) to detect VP1 gene  
379 using AN232 forward primer (5'-CCAGCACTGACAGCA) at 2602 to 2616 nucleotide  
380 position and AN233 reverse primer (5'- TACTGGACCACCTGG) at 2977 to 2963 nucleotide  
381 position <sup>26</sup>.

382

383 **Rapid amplification of cDNA ends-PCR (RACE PCR).** Total RNA was extracted from heart  
384 tissues and peripheral blood samples taken from patients with acute myocarditis using QIAamp  
385 Viral RNA mini kit (Qiagen). Viral RNA (200 ng) were reverse transcribed using Superscript  
386 II kit (Invitrogen, ThermoFisher) with 400nM AvCRev (Rev. :5'-  
387 AACAGGCGCACAAAGCTACCG) <sup>7</sup> and was incubated 5min at 65°C and then 5min on ice.

16

388 The 5'extremity of cDNA was then ligated with 1X T4 DNA ligase buffer (Ambion,  
389 ThermoFisher), 50nM Trp1 DNA adaptor for 5'NCR terminal deletion identification (Fwd: 5'-  
390 H-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT), 5 units of Ambion T4 DNA Ligase (Ambion,  
391 ThermoFisher) was added to the cDNA-mix and was incubated overnight at 16°C. Positive  
392 cDNA were amplified by a classical PCR reaction using KAPA Taq polymerase kit consisting  
393 of 1X KAPA TaqA buffer, 200µM dNTPs, 400nM AvCRev, 400nM Trp1 (Fwd: 5'-  
394 CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT), 1U KAPA Taq polymerase in a mix of 25µL with a  
395 cycling process composed of one cycle for 3min at 95°C, 40 cycles of 30s at 95°C, 30s at 55°C,  
396 30s at 72°C, finishing in a cycle of 30s at 72°C. A 2% agarose gel electrophoresis was  
397 performed in order to control the length of the PCR products. Amplicons were then sized and  
398 quantified by Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analyses using Agilent High Sensitivity DNA  
399 Kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. The area of each relevant  
400 electrophoresis peak were integrated using software integrated analytic approach  
401 (**Supplementary Figure S2**)<sup>27-29</sup>. The quantification ranges of the RACE-PCR assay followed  
402 by a micro-electrophoresis device were assessed using serial 10-fold dilutions of synthetic full-  
403 length or 5'terminally deleted CVB3 forms in human cardiac or plasmatic total RNA extracts  
404 of EV-negative human samples.

405

406 **Transfection.**  $2.0 \times 10^5$  HCM or HeLa229 cells per well were seeded in 24-well plates (Nunc  
407 delta surface, Thermo Scientific). The plates were incubated overnight at 37°C. Cells were  
408 washed with DPBS (Thermo Scientific) was added. The transfection mixtures (0.1mL)  
409 consisted of 1µg of synthetic RNA and 1µl of Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific) in Opti-  
410 MEM Glutamax. The mixtures were incubated for 20min at room temperature. Then 100µl of  
411 the mixture was added to the cells, and plates were transferred to a cell incubator at 37°C for 8

412 hours. The supernatants were collected, and the cells lysed by 500 $\mu$ L of TRI Reagent (Sigma–  
413 Aldrich Corporation, Lyon, France).

414

415 **Reverse transcription-quantitative PCR using SybrGreen (RT-qPCR).** RNA was extracted  
416 from cultured cells with TRI Reagent (Sigma–Aldrich Corporation, Lyon, France) and reverse  
417 transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen Life Technologies)  
418 following to the manufacturer’s instructions. cDNA was subjected to PCR using PowerUp  
419 SYBR Green Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific) to detect IFN- $\beta$  expression. The  
420 primers used for PCR detection as follows: for human IFN- $\beta$ , forward primer  
421 AGCTGAAGCAGTTCCAGAAG and reverse primer AGTTCATTCCAGCCAGTGC.  
422 Primers specific to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (forward primer  
423 AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT and reverse primer CCCCACTTGATTTTGGAGGGA)  
424 was served as the internal control. PCR was carried out in StepOnePlus Real-Time PCR  
425 Systems (ThermoFisher Scientific) programmed as follows: 94°C for 15s, 63°C for 10s, and  
426 72°C for 15 s for a total of 40 cycles, before melting curve. Results were analyzed by the  $\Delta\Delta$ CT  
427 method, where CT is threshold cycle, and normalized to GAPDH mRNA. Data are represented  
428 as levels of mRNA relative to the mock transfected control samples and are displayed as the  
429 means  $\pm$  SD of results from at least three independent experiments.

430

431 **Quantitative ELISA assays for IFN- $\beta$ .** For the quantitative determination of human IFN- $\beta$   
432 concentrations in supernatants of cultured cells, ELISA assays using commercially available  
433 Human IFN-beta DuoSet ELISA kits (R&D Systems, France) were performed according to the  
434 manufacturer’s instructions.

435

436 ***In vitro* dephosphorylation assays.** The dephosphorylation of synthetics RNAs was carried  
437 out using Antarctic phosphatase (10 U), 1X Antarctic Phosphatase buffer (New England  
438 BioLabsGmbH, Frankfurt, Germany) and 2 µg of synthetics RNAs in 20 µL final volume for  
439 1h at 37°C. Enzymes were deactivated at 80°C for 2 min. RNAs quality was controlled by  
440 loading 8 µL of each controls and dephosphorylation products by electrophoresis on 1% agarose  
441 gel.

442

443 **Statistical analysis.** All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7  
444 (GraphPad) and SAS version 9.4 (SAS Institute Inc.). Quantitative variables were compared  
445 using the Mann Whitney U test and a P-value < 0.05 was considered as statistically significant.  
446 Linear regression was performed, and slopes were compared using Spearman correlation test.  
447 Because selected human biological samples (peripheral blood or heart tissues samples taken  
448 from acute myocarditis patients) were of very limited availability and because number was not  
449 extendable; we did not have prior data to calculate it and we did not *a priori* calculate the  
450 number of subjects to include in the present study.

451

#### 452 **Data availability**

453 We declare that all the data supporting the findings of this study are available within the paper  
454 and the Supplementary Information files.

455 The study materials will not be made available to other researchers for purposes of reproducing  
456 the results or replicating the procedure, because the human biological samples (blood and  
457 cardiac tissue samples) as well as RNA extracted from HeLa229 and human primary  
458 cardiomyocytes used in our experiments remain limited biological sources.

459

460

461 **REFERENCES**

462

- 463 1. Dennert, R., Crijns, H. J. & Heymans, S. Acute viral myocarditis. *Eur. Heart J.* **29**, 2073–  
464 2082 (2008).
- 465 2. Pallansch, M. A. & Roos, R. Enteroviruses : Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses,  
466 and Newer Enteroviruses. in *Fields Virology* vol. 1 840–893 (Lippincott William &  
467 Wilkens Compagny, 2007).
- 468 3. Racaniello, V. R. Picornaviridae : The viruses and Their Replication. in *Fields Virology*  
469 vol. 1 795–838 (Knipe & Howley, 2007).
- 470 4. Chapman, N. M., Kim, K.-S., Drescher, K. M., Oka, K. & Tracy, S. 5' terminal deletions  
471 in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. *Virology*  
472 **375**, 480–491 (2008).
- 473 5. Kim, K.-S. *et al.* 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in  
474 murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-  
475 strand viral RNA. *J. Virol.* **79**, 7024–7041 (2005).
- 476 6. Kim, K.-S., Chapman, N. M. & Tracy, S. Replication of coxsackievirus B3 in primary cell  
477 cultures generates novel viral genome deletions. *J. Virol.* **82**, 2033–2037 (2008).
- 478 7. Bouin, A. *et al.* Major Persistent 5' Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in  
479 Human Endomyocardial Tissues. *Emerg Infect Dis* **22**, 1488–1490 (2016).
- 480 8. Bouin, A. *et al.* Enterovirus Persistence in Cardiac Cells of Patients With Idiopathic  
481 Dilated Cardiomyopathy Is Linked to 5' Terminal Genomic RNA-Deleted Viral  
482 Populations With Viral-Encoded Proteinase Activities. *Circulation* **139**, 2326–2338  
483 (2019).
- 484 9. Feng, Q. *et al.* MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-  
485 infected cells. *Cell Rep* **2**, 1187–1196 (2012).

- 486 10. Feng, Q. *et al.* Coxsackievirus Cloverleaf RNA Containing a 5' Triphosphate Triggers an  
487 Antiviral Response via RIG-I Activation. *PLoS ONE* **9**, e95927 (2014).
- 488 11. Lévêque, N. *et al.* Functional Consequences of RNA 5'-Terminal Deletions on  
489 Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *Journal*  
490 *of Virology* **91**, (2017).
- 491 12. Ertel, K. J., Brunner, J. E. & Semler, B. L. Mechanistic consequences of hnRNP C  
492 binding to both RNA termini of poliovirus negative-strand RNA intermediates. *J. Virol.*  
493 **84**, 4229–4242 (2010).
- 494 13. Brunner, J. E., Ertel, K. J., Rozovics, J. M. & Semler, B. L. Delayed kinetics of poliovirus  
495 RNA synthesis in a human cell line with reduced levels of hnRNP C proteins. *Virology*  
496 **400**, 240–247 (2010).
- 497 14. Jaramillo, L., Smithee, S., Tracy, S. & Chapman, N. M. Domain I of the 5' non-translated  
498 genomic region in coxsackievirus B3 RNA is not required for productive replication.  
499 *Virology* **496**, 127–130 (2016).
- 500 15. Reikine, S., Nguyen, J. B. & Modis, Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of  
501 RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology* **5**, (2014).
- 502 16. Fung, G., Luo, H., Qiu, Y., Yang, D. & McManus, B. Myocarditis. *Circ. Res.* **118**, 496–  
503 514 (2016).
- 504 17. Lévêque, N. *et al.* Functional Consequences of RNA 5'-Terminal Deletions on  
505 Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *Journal*  
506 *of Virology* **91**, e00423-17 (2017).
- 507 18. Chapman, N. M., Kim, K.-S., Drescher, K. M., Oka, K. & Tracy, S. 5' terminal deletions  
508 in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. *Virology*  
509 **375**, 480–491 (2008).

- 510 19. Gamarnik, A. V. & Andino, R. Two functional complexes formed by KH domain  
511 containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *RNA* **3**, 882–892  
512 (1997).
- 513 20. Holmblat, B. *et al.* Nonhomologous Recombination between Defective Poliovirus and  
514 Coxsackievirus Genomes Suggests a New Model of Genetic Plasticity for Picornaviruses.  
515 *mBio* **5**, e01119-14 (2014).
- 516 21. Muslin, C., Joffret, M.-L., Pelletier, I., Blondel, B. & Delpeyroux, F. Evolution and  
517 Emergence of Enteroviruses through Intra- and Inter-species Recombination: Plasticity  
518 and Phenotypic Impact of Modular Genetic Exchanges in the 5' Untranslated Region.  
519 *PLoS Pathog* **11**, e1005266 (2015).
- 520 22. Vignuzzi, M. & López, C. B. Defective viral genomes are key drivers of the virus–host  
521 interaction. *Nat Microbiol* **4**, 1075–1087 (2019).
- 522 23. Sanchez David, R. Y. *et al.* Comparative analysis of viral RNA signatures on different  
523 RIG-I-like receptors. *Elife* **5**, e11275 (2016).
- 524 24. Caforio, A. L. P. *et al.* Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management,  
525 and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology  
526 Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* **34**, 2636–2648,  
527 2648a–2648d (2013).
- 528 25. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular  
529 Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–  
530 1549 (2018).
- 531 26. Nix, W. A., Oberste, M. S. & Pallansch, M. A. Sensitive, seminested PCR amplification  
532 of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original  
533 clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2698–2704 (2006).

- 534 27. Panaro, N. J. *et al.* Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent  
535 2100 bioanalyzer. *Clin. Chem.* **46**, 1851–1853 (2000).
- 536 28. Nachamkin, I. *et al.* Agilent 2100 bioanalyzer for restriction fragment length  
537 polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. *J. Clin. Microbiol.* **39**,  
538 754–757 (2001).
- 539 29. Lu, C.-Y., Tso, D.-J., Yang, T., Jong, Y.-J. & Wei, Y.-H. Detection of DNA mutations  
540 associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer. *Clin. Chim. Acta*  
541 **318**, 97–105 (2002).

542  
543

#### 544 **Acknowledgments**

545 The authors thank the staff at the collaborating clinical sites and references laboratory. We are  
546 grateful for Nora Chapman and Steven Tracy (University of Nebraska Medical Center, USA)  
547 for helpful discussions.

548

#### 549 **French enterovirus myocarditis study group (FEMSG)**

550 Collaborators included the following: National Reference Center of Enterovirus and  
551 Parechovirus, Clermont-Ferrand, France (A. M., C. H.), University of Clermont Auvergne,  
552 Clermont-Ferrand, France (A. M., C. H.), Centre Hospitalier Universitaire Clermont-Ferrand,  
553 France (A. M., C. H., Marie-Laure Mathieu, Ellia Mezgueldi, Matthieu Verdan, Pascal  
554 Motreff); National Reference Center of Enterovirus and Parechovirus, Lyon, France (B. L., I.  
555 S.) and Hospices Civils de Lyon, France (B. L., I. S., Samira Fafi-Kremer and Quentin Lepiller);  
556 University of Lyon, Lyon, France (B. L., I. S.) and Hôpital Européen Georges Pompidou  
557 (HEGP), Paris University Hospital, AP-HP, Paris , France (Patrick Bruneval).

558

559

560 **Author contributions**

561 L. A. conceived the clinical and immune study. A. M., C. H., B. L., I. S., Y. N. established the  
562 cohort and supervised data collection. M. G. and A-L. L. performed the laboratory testing,  
563 supervised by L. A.; Y. N. performed the statistical analyses supervised by L. A., and M. G.  
564 L.A., M.G. F.B contributed to the interpretation of the results. L. A. and M. G wrote the  
565 manuscript. L.A., M.G. Y. N, A-L. L, F.B. and F. B-S provided valuable input to interpretation  
566 of the data and critically reviewed the manuscript for important intellectual content. All authors  
567 reviewed and approved the final version of the manuscript.

568

569 **Financial support**

570 This work was supported by grant from the “Fédération Française de Cardiologie” (FFC grant  
571 2019 “Etude CardioVir”) and by a local research grant for emerging research teams from the  
572 University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), France. M.G. is supported by a University  
573 of Reims Champagne-Ardenne (URCA) PhD grant. M.G. was supported by Boehringer  
574 Ingelheim and the National Institutes of Health grants funded the author to present a part of this  
575 work (Poster abstract number: x2065-7588-50505, P39-2) at the 38th American Society for  
576 Virology (ASV) congress, in July 2019, at the University of Minnesota, Minneapolis, USA.

577

578 **Competing interests**

579 The authors declare non-competing interest.

580

581

582

583

584 **Figures**

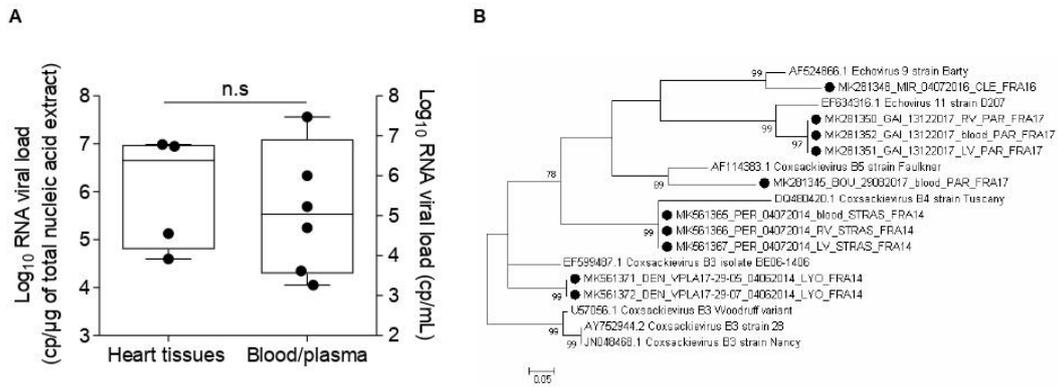
585

586 **Table 1: Demographic, clinical and virological data in study acute myocarditis patients**

<b>Demographic data</b>	
Number of patients with myocarditis/Number of samples (n=)	6/10
Median age (days)	21.6 [3.6 - 90]
Sex (males/female)	5/1
<b>Clinical data</b>	
Blood samples (%)	6 (60)
Hearts samples (autoptic) (%)	4 (40)
Median delay between beginning of symptoms and time of hospitalization (days)	3.58 [1-7]
<b>Virological data</b>	
Median EV RNA level detection (blood samples)(genomes copies/ml)	$1.09 \times 10^5$ [ $1.82 \times 10^3 - 2.98 \times 10^7$ ]
Median EV RNA level detection (heart samples) (genomes copies/ $\mu$ g)	$4.5 \times 10^6$ [ $3.97 \times 10^4 - 9.65 \times 10^6$ ]
Proportion of full-length form (FL) (%)	7 [0 - 18.0]
Proportion of 15 to 36 nt TD forms (%)	3 [0 - 15.0]
Proportion of full-length and 15 to 36 nt TD forms (%)	10 [0 - 18.0]
Proportion of 37 to 50 nt TD forms (%)	90 [66.97 - 94.95]

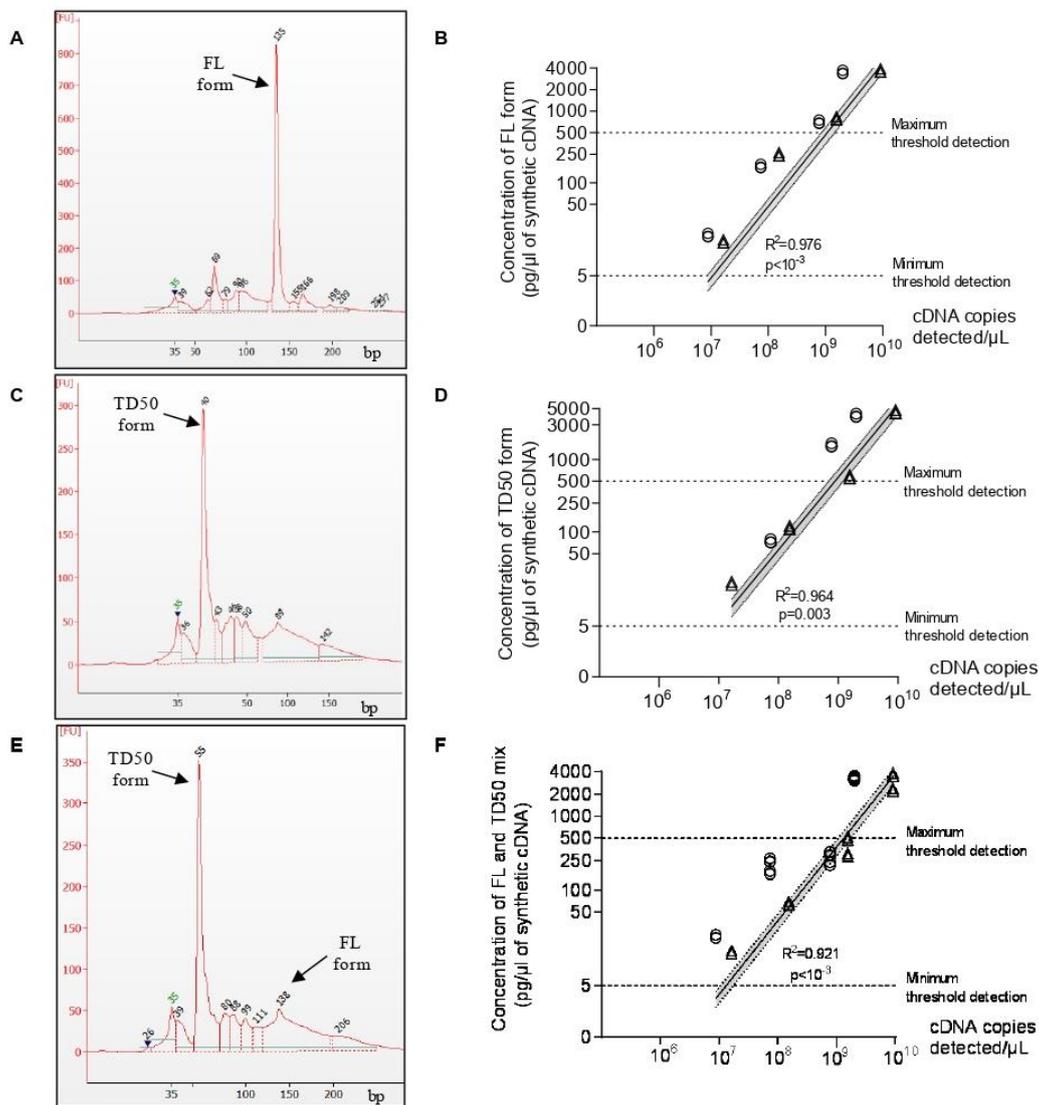
587

588



589

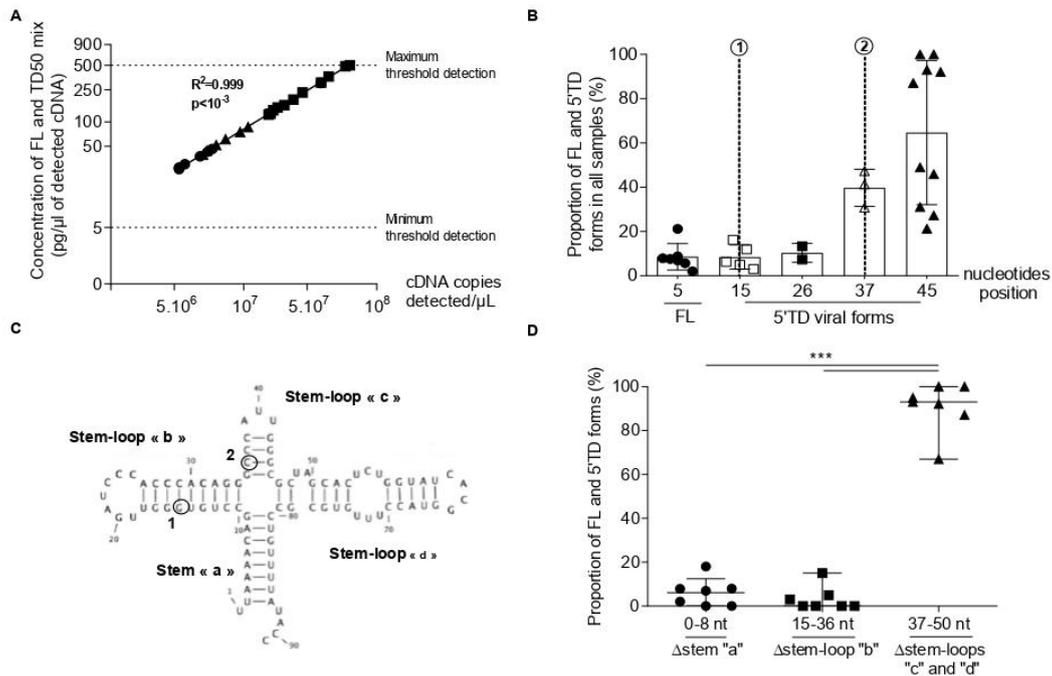
590 **Figure 1/ Enterovirus-RNA genome levels and phylogenetic viral VP1 gene sequences**  
 591 **obtained from heart tissues or peripheral blood samples from acute myocarditis**  
 592 **patients. A.** Viral RNA genomic replication activity was assessed using a RT-qPCR assay on  
 593 heart samples (copies/ng) (n=4) or blood and plasma samples (copies/mL) (n=6). Data represent  
 594 the median with range. Non-significant (n.s) according to Mann-Whitney U test. **B.** Molecular  
 595 phylogenetic analysis (nucleotide comparative analysis) of the enterovirus VP1 gene was  
 596 inferred by using the maximum likelihood method with MEGA version 7.0. A total of 1000  
 597 bootstrap iteration has been calculated to assess the toughness of the method, percentage of  
 598 trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The scale  
 599 refers to the distance between sequences. Black dots represent the eleven identified strains  
 600 isolated during the present study. GenBank accession nos. of the eleven identified strains are  
 601 the following: MK281350-MK281351-MK281352-MK281348-MK281345-MK561365-  
 602 MK561366-MK561367-MK561371- MK561372)



603

604 **Figure 2: Quantitative detection of undeleted and 5'terminally deleted EV-B populations**  
 605 **in clinical samples. A.** Electropherograms of RACE-PCR FL synthetic cDNA (135 bp ± 10%).  
 606 **B.** Quantification of EV-B full-length (FL) form after serial 10-fold dilutions of synthetic FL  
 607 form diluted in human cardiac (○) or plasmatic (Δ) total RNA extracts of EV-negative human  
 608 samples (n=3). Linear regression curve between cDNA copies detected per μL and  
 609 concentration of full-length synthetic cDNA. **C.** Electropherograms of TD50 synthetic cDNA  
 610 (55 bp ± 10%) after RACE-PCR. Image obtained from “Agilent 2100 Bioanalyzer” after  
 611 analysis with High sensitivity DNA (Agilent). **D.** Quantification of EV-B 5'terminally deleted  
 612 of 50 nt (TD50) form after serial 10-fold dilutions of synthetic TD50 form diluted in human  
 613 cardiac (○) or plasmatic (Δ) total RNA extracts of EV-negative human samples (n=3). Linear  
 614 regression curve between cDNA copies detected per μL and concentration of TD50 form of  
 615 synthetic cDNA. **E.** Electropherograms of FL and TD50 mix (95% of TD50 form with 5% of  
 616 FL form) synthetic cDNA after RACE-PCR. Image obtained from “Agilent 2100 Bioanalyzer”  
 617 after analysis with High sensitivity DNA (Agilent). **F.** Quantification of EV-B FL and TD50

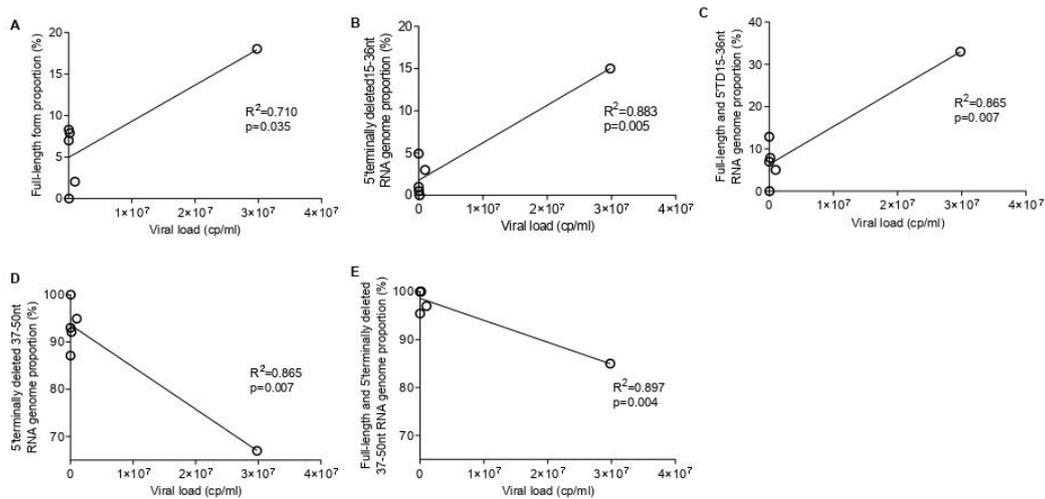
618 mix (95% of TD50 form with 5% of FL form) forms after serial 10-fold dilutions of synthetic  
619 FL and TD50 synthetic forms diluted in human cardiac (○) or plasmatic (Δ) total RNA extracts  
620 of EV-negative human samples (n=3). Linear regression curve between cDNA copies detected  
621 per  $\mu\text{L}$  and concentration of mix FL and TD50 form of synthetic cDNA. The dashed lines  
622 indicate the thresholds of detection. Linear regression was performed, and slopes were  
623 compared using Spearman test. FL, full-length; TD, terminally deleted, bp, base paired.  
624



625

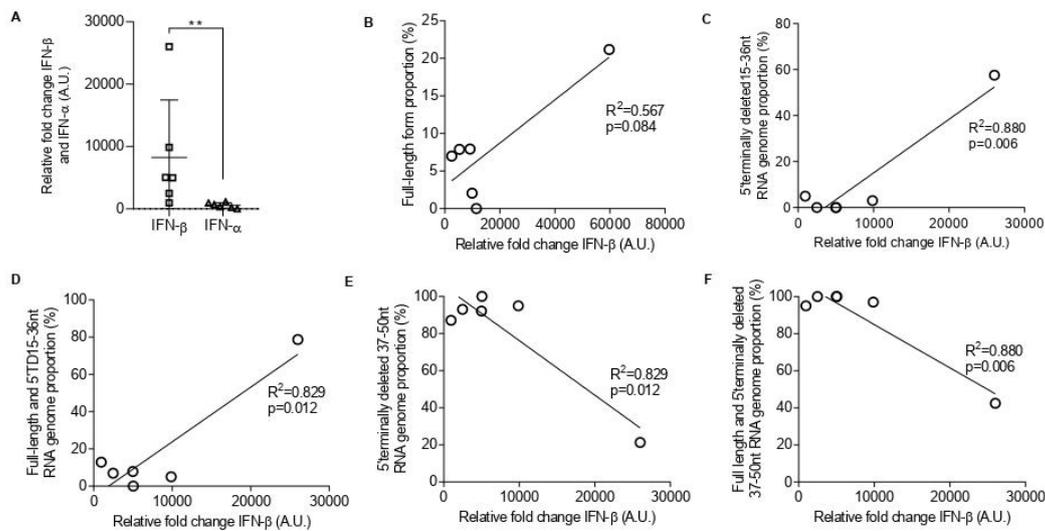
626 **Figure 3: Detection of full-length and 5' terminally deleted EV-B population levels in heart**  
 627 **and peripheral blood samples. A.** Linear regression curve between cDNA copies detected per  
 628  $\mu\text{L}$  and concentration of FL and 5'TD forms of detected cDNA in heart and peripheral blood  
 629 samples ( $n=10$ ). Linear regression was performed, and slopes were compared using Spearman  
 630 test. **B.** Identification of FL and 5'TD EV-B and proportion of each 5'TD forms of study  
 631 samples. **C.** Two-dimensional representation of the EV-B 5' non-coding region (NCR) RNA  
 632 sequences inducing a cloverleaf replant with a stem "a", and three stem-loop "b" to "d" essential  
 633 for EV-B replication. In position 1, the position of the EV-B 5' terminally deleted forms with  
 634 15 nucleotides. In position 2, the position of the EV-B 5'TD forms with 37 nucleotides. **D.**  
 635 Proportion of 5'TD forms (15-36 nt and 37-50 nt) and FL form in heart and peripheral blood  
 636 samples. Data represent the mean  $\pm$  SD. Viral populations deleted from less than 8 nucleotides  
 637 were considered as full-length viral populations. FL, full-length; TD, terminally deleted, bp,  
 638 base paired, nt, nucleotides.  
 639

29



640

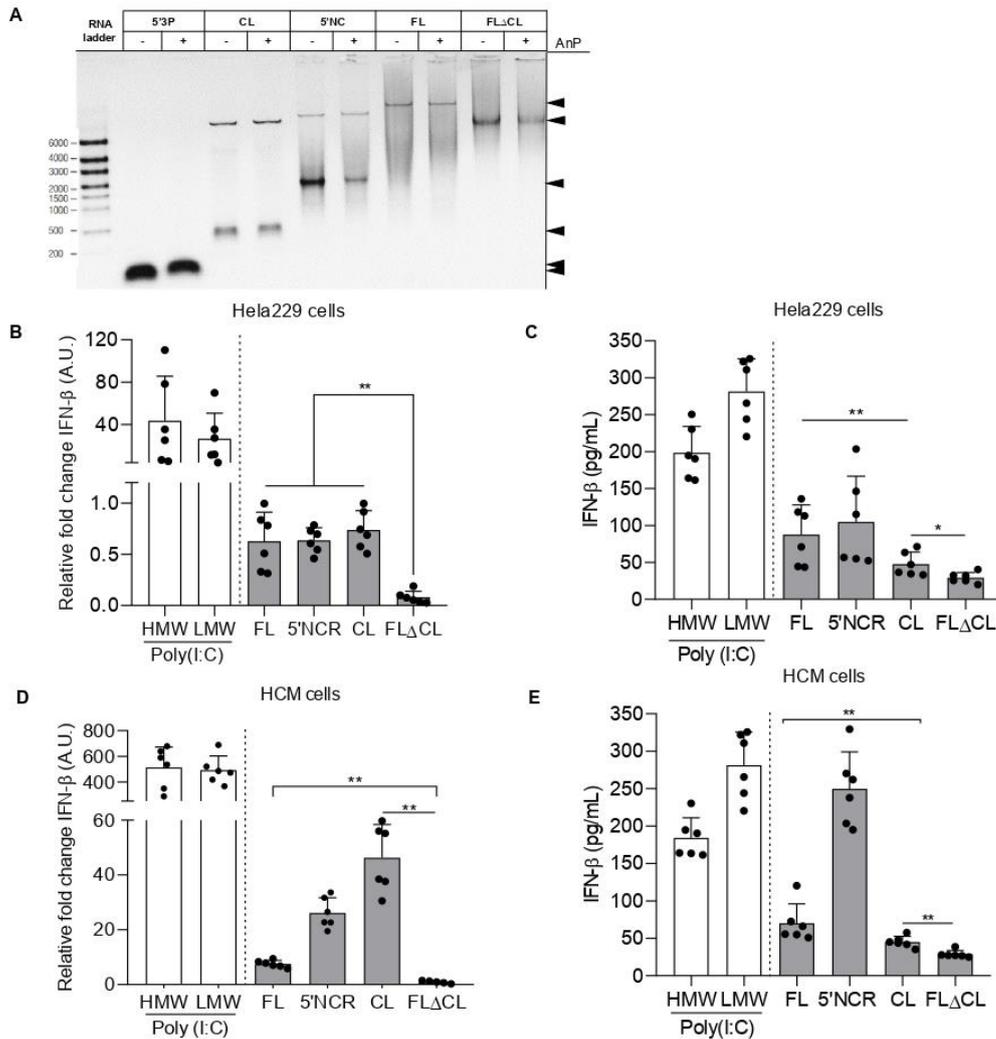
641 **Figure 4: Relationships between EV-B full-length or 5'terminally deleted RNA population**  
 642 **proportions and total viral RNA levels in peripheral blood of acute myocarditis patients.**  
 643 **A.** FL form proportion (%) correlation between EV-B viral load (cp/mL) (n=6). **B.** 5'terminally  
 644 deleted 15-36 nt RNA genome proportion (%) correlation between EV-B viral load (cp/mL)  
 645 (n=6). **C.** Full-length associated with 5'terminally deleted 15-36 nt RNA genome proportion  
 646 (%) correlation between EV-B viral load (cp/mL) (n=6). **D.** 5'terminally deleted 37-50 nt RNA  
 647 genome proportion (%) correlation between EV-B viral load (cp/mL) (n=6). **E.** Full-length  
 648 associated with 5'terminally deleted 37-50 nt RNA genome proportion (%) correlation between  
 649 EV-B viral load (cp/mL) (n=6). Linear regression was performed, and slopes were compared  
 650 using Spearman test. FL, full-length; TD, terminally deleted.  
 651



652

653 **Figure 5: Relationships between EV-B full-length or identified EV-B 5'terminally deleted**  
654 **population proportions and type 1 IFN levels.** **A.** IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  semi-quantitative RT-  
655 qPCR analysis in peripheral blood samples expressed as fold change over control patients after  
656 normalization to housekeeping mRNA expression. Data represent the mean  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$   
657 according to Mann-Whitney U test. **B.** FL form proportion (%) correlation between relative  
658 fold change of IFN- $\beta$  (A.U.) (n=6). **C.** 5'terminally deleted 15-36 nt RNA genome proportion  
659 (%) correlation between relative fold change of IFN- $\beta$  (A.U.) (n=6). **D.** Full-length and  
660 5'terminally deleted 15-36 nt RNA genome proportion (%) correlation between relative fold  
661 change of IFN- $\beta$  (A.U.) (n=6). **E.** 5'terminally deleted 37-50 nt RNA genome proportion (%)  
662 correlation between relative fold change of IFN- $\beta$  (A.U.) (n=6). **F.** Full-length and 5'terminally  
663 deleted 37-50 nt RNA genome proportion (%) correlation between relative fold change of IFN-  
664  $\beta$  (A.U.) (n=6). Linear regression were performed, and slopes were compared using Spearman  
665 test. FL, full-length; TD, terminally deleted.  
666

31



667

668 **Figure 6: IFN- $\beta$  mRNA synthesis and secretion levels by HeLa229 or human primary**  
 669 **cardiac cells transfected by CVB3/28 full-length or 5'terminally deleted RNA forms. A.**  
 670 **Synthetic CVB3/28 RNAs 5'NC, CL, FL and TD100 were untreated or treated by Antarctic**  
 671 **Phosphatase (AnP). Result of synthetic RNA forms treatment by AnP was visualized using 1%**  
 672 **agarose gel electrophoresis. Arrows indicated the RNA band sizes on the gel picture. B and D.**  
 673 **IFN- $\beta$  mRNA were expressed as fold change over mock transfected cells after normalization to**  
 674 **housekeeping mRNA expression respectively in immortalized HeLa229 cells and in human**  
 675 **primary cardiomyocytes. Data represent mean  $\pm$  SD (n=3) (Mann-Whitney U test; \*\*P<0.01).**  
 676 **C and E.** IFN- $\beta$  levels were quantified by ELISA in supernatants of cardiomyocytes cells at 8  
 677 hours' post-transfection of various EV-B RNA forms. Data represent mean  $\pm$  SD (n=3) (Mann-  
 678 Whitney U test; \* P<0.05 and \*\*P<0.01). CVB3/28 RNA, full-length form (FL) and deleted  
 679 CVB3/28 forms of 100 nucleotides (TD100); Positive controls: CL (Cloverleaf, Domain I),  
 680 5'NC: 5'-non-coding region; LMW (poly (I:C) low molecular weight), HMW (poly (I:C) high  
 681 molecular weight).  
 682

32

683 **Supplementary data**

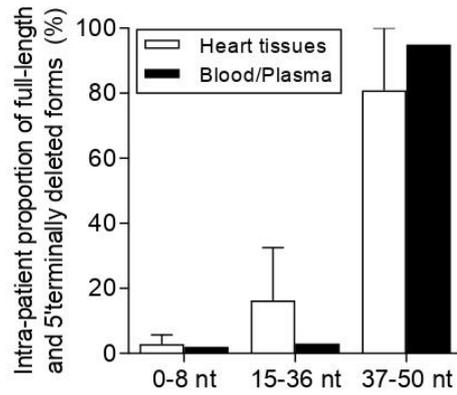
684

685 **Tableau S1: Primers used for EV detection, PCR amplification, and sequencing**

Primers	Sense	Sequences (5'-3')	Gene	Location (nt)
NC1M	F	CCCTGAATGCGGCTAATCC	5'UTR - Domain V	456-474
S-Ent	F	FAM-AACCGACTACTTGGGIGTCCGIGTTTC-TAMRA	5'UTR - Domain V	539-566
E2	R	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	5'UTR - Domaine VI & VII	582-601
AN232	F	CCAGCACTGACAGCA	VP1	2602-2616
AN233	R	TACTGGACCACCTGG	VP1	2977-2963
222	F	CICCIGCIGGLAYRWACAT	VP1	2969-2951
224	R	GCIATGYTIGGLACICAYRT	VP3	1977-1996
AN88	F	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	VP1	2977-2951
AN89	R	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	VP1	2602-2627

686 *Footnotes : F correspond to Forward or sense primers and R correspond to Reverse or antisense primers*

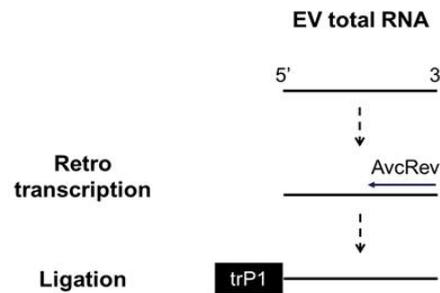
687



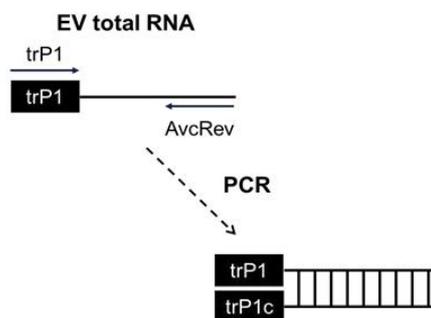
688

689 **Figure S1: Detection of full-length and 5' terminally deleted EV-B population levels in**  
 690 **heart and peripheral blood samples in intra-patient.** Comparative analysis of proportion of  
 691 viral 5'TD (15-36 nt and 37-50 nt forms) and FL form in heart tissues and peripheral blood  
 692 samples in intra-patient (1 vs. 2 samples). Data represent the mean  $\pm$  SD using Mann-Whitney  
 693 U test.

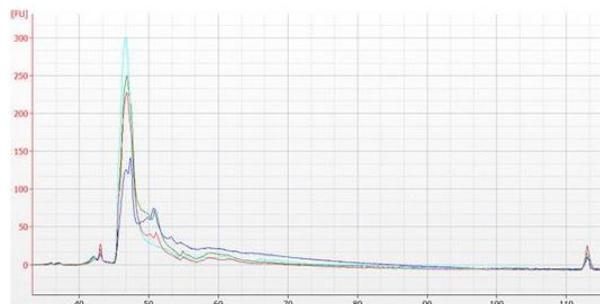
### A- cDNA generation and Adapter Ligation



### B- RACE-PCR



### C- Microelectrophoresis Agilent®



694

695

696 **Figure S2: Schematic representation of RACE-PCR following by micro-electrophoresis**

697 **performed on total nucleic acid extracted from heart tissues and peripheral blood samples**

698 **of acute myocarditis patients. A.** cDNA generation and adapter ligation: a retro transcription

699 step was performed by using AvcRev primer and allowed the generation of a cDNA of the 5'

700 non-coding region until the terminal. TrP1 adapter was then ligated to the 5' extremity of cDNA

701 generated. **B.** Rapid amplification of cDNA ends PCR (RACE): a classical PCR using primers

702 trP1 and AvcRev was performed on cDNA generated from cDNA ligation and enabled the

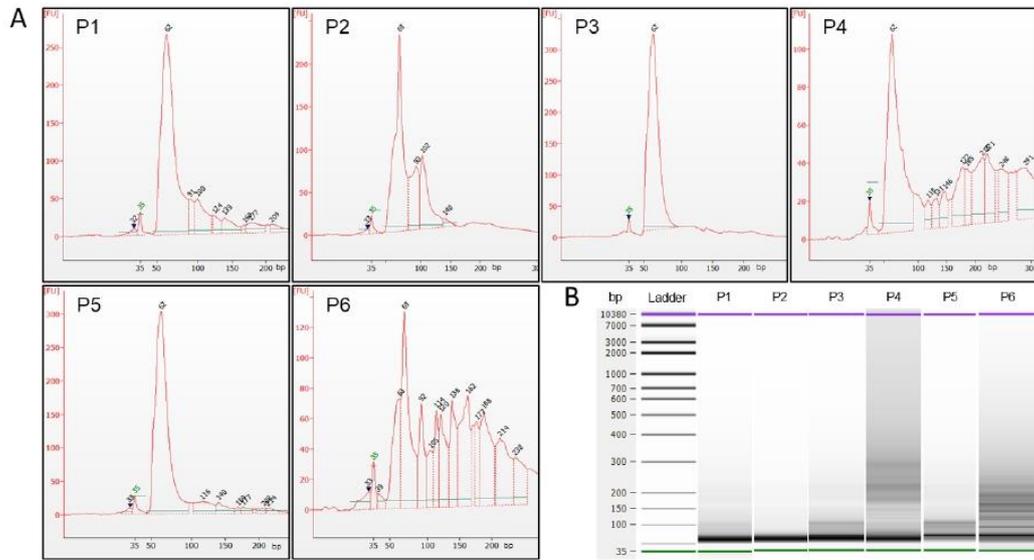
703 amplification of the 5' terminal genomic region. The length of the amplicons was assessed by

704 2% agarose gel electrophoresis. **C.** Micro-electrophoresis Agilent: DNA chip containing micro-

705 channels allowing nucleic acid fragments bases separation after electrophoresis. Application of

706 Agilent High Sensitivity DNA kit for sizing and quantitation of DNA samples. EV, enterovirus

35



707

708

709

710

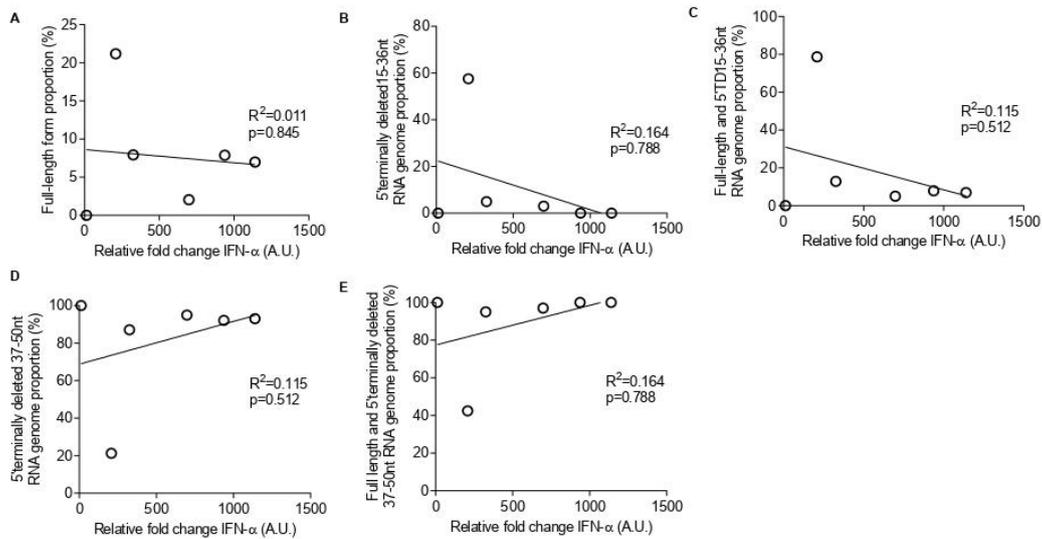
711

712

713

714

**Figure S3: Identification of full-length and EV-B TD forms in peripheral blood samples of acute myocarditis patients.** **A.** Electropherograms of isolated 5' end viral cDNA detected from patient 1 to 6 corresponding to the acute myocarditis study cases. **B.** The image shows a digital electropherogram obtained from Agilent bioanalyzer. The lane 1 shows DNA ladder. Lanes 2 to 6 correspond to patients 1 to 6 suffering from acute myocarditis.



715

716

717 **Figure S4: Relationships between EV-B full-length or identified EV-B 5'terminally**  
 718 **deleted population proportions and IFN- $\alpha$  level. A.** FL form proportion (%) correlation  
 719 between relative fold change of IFN- $\alpha$  (A.U.) (n=6). **B.** 5'terminally deleted 15-36nt RNA  
 720 genome proportion (%) correlation between relative fold change of IFN- $\alpha$  (A.U.) (n=6). **C.** Full-  
 721 length and 5'terminally deleted 15-36nt RNA genome proportion (%) correlation between  
 722 relative fold change of IFN- $\alpha$  (A.U.) (n=6). **D.** 5'terminally deleted 37-50nt RNA genome  
 723 proportion (%) correlation between relative fold change of IFN- $\alpha$  (A.U.) (n=6). **E.** Full-length  
 724 and 5'terminally deleted 37-50nt RNA genome proportion (%) correlation between relative fold  
 725 change of IFN- $\alpha$  (A.U.) (n=6). Linear regression were performed, and slopes were compared  
 726 using Spearman test. FL, full-length; TD, terminally deleted.

## **VI. Article n°2 : Les populations de virus Coxsackie-B3 naturellement tronquées dans le domaine-I (« Cloverleaf ») de l'ARN génomique régulent l'activation de la voie des interférons de type I au cours de la myocardite et de la pancréatite aigüe chez la souris DBA2/J.**

---

Des populations majeures d'entérovirus B (EV-B) caractérisées par des délétions nucléotidiques en région 5' terminale non-codante (5'NC) et allant jusqu'à 50 nucléotides ont été associées au développement de la myocardite aiguë et chronique et du diabète de type 1 dans des modèles de souris et également chez l'homme. Le passage d'une infection aiguë à une infection chronique de type persistante par les EV-B pourrait être lié à une sélection précoce de formes virales ARN présentant des délétions dans la région 5'NC et dont la capacité d'induction de la voie des interférons de type I serait réduite.

Dans la deuxième phase de notre travail, nous avons exploré dans un modèle d'infection systémique au virus coxsackie B3 (CVB-3) chez la souris DBA2/J, l'impact de la dynamique d'apparition des formes tronquées en région 5'NC sur le profil de la réponse inflammatoire et en particulier sur la production des interférons (IFN) de type I dans le myocarde et les autres tissus cibles connus au cours des phases aiguës et chroniques de l'infection virale.

En utilisant un modèle connu et validé par notre groupe de recherche d'infection systémique à CVB3/28 chez la souris DBA2/J, nous avons observé des lésions histologiques aiguës dans les tissus cardiaques, pancréatiques et hépatiques évoluant vers des lésions chroniques dans le cœur et le pancréas 14 jours après l'infection. Dans ces tissus, nos résultats ont mis en évidence une induction significative de la réponse de type Th-1 (IL10, MCP-1, TNF- $\alpha$ ) mais pas des taux d'IFN- $\beta$  pendant la phase d'infection aiguë. En utilisant une technique quantitative de RACE-PCR dans les tissus cibles, nous avons observé une émergence précoce et continue de populations virales majeures tronquées en région 5'NC associées à des formes ARN virales complètes mineures dans les tissus cardiaques, pancréatiques et hépatiques. La production *in vitro* de différentes formes d'ARN synthétiques de CVB3/28 tronquées en région 5'NC et leur transfection dans des cardiomyocytes humains primaires (HCM)

a permis de démontrer que les formes ARN d'EV-B naturellement tronquées de 37 à 50 nucléotides produites *in vivo*, étaient des virus faiblement répliatifs associés à des populations auxiliaires virales minoritaires complètes ou tronquées de 8 à 36 nucléotides. Lors de la phase aiguë de l'infection, les taux d'IFN- $\beta$  étaient corrélés négativement aux proportions de formes d'EV-B tronquées de 37 à 50 nucléotides mais ils étaient corrélés positivement aux proportions de formes ARN virales génomiques complètes et tronquées de 8 à 36 nucléotides dans les tissus cardiaques et pancréatiques (respectivement  $R^2=0,55$ ,  $P=0,014$  et  $R^2=0,65$ ,  $P=0,01$ ). La transfection de différentes formes d'ARN synthétiques de CVB3/28 complètes ou tronquées en région 5'NC dans le cardiomyocyte primaire humain a confirmé un effet régulateur des formes tronquées en région 5'NC sur l'induction de la voie des interférons de type I et nous a permis d'identifier la tige-boucle « c » ou « d » du domaine I de l'ARN génomique (« Cloverleaf ») comme la structure nucléotidique immuno-modulatrice responsable de l'induction de la voie des interférons de type I. Nos résultats mettent en évidence l'émergence précoce de populations majeures d'EV-B tronquées en région 5'NC dont les proportions régulent les activités de répliation génomique virale et les niveaux des IFN- $\beta$  pendant la phase aiguë de l'infection, modulant les mécanismes de détection immunitaire innée et favorisant potentiellement une infection virale persistante dans les tissus cardiaques et pancréatiques. Ces résultats apportent des éléments clefs sur le rôle des formes tronquées des ARN génomiques des EV-B en tant que principaux facteurs physiopathologiques à l'origine des infections persistantes à EV-B chez l'homme.

Au final, l'ensemble de ces résultats souligne l'impact majeur de la région 5'NC de l'ARN génomique des EV-B sur la réponse IFN de type I dont les mécanismes de la reconnaissance par les senseurs cytoplasmiques de type RLRs (RIG-I, MDA5 et LGP2) dans la cellule cible restent à explorer. L'exploration de ces événements d'induction de la voie des interférons de type I est un prérequis indispensable à la connaissance de l'activation de la réponse immunitaire innée. De nouvelles données sur l'identification des séquences et /ou structures des ARNs génomiques viraux « immunomodulateurs » pourraient conduire à de nouvelles stratégies ciblées d'immunothérapie par l'activation des senseurs RIG-I ou MDA5.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

**Full Title**

**Natural Coxsackievirus-B3 populations with 5' terminal deletions in RNA domain I regulate type 1 interferon pathway activation during acute myocarditis and pancreatitis**

**Short Title**

**Type 1 interferon regulation by 5' terminally deleted CVB3-RNA forms**

D Callon<sup>1,2</sup>, M Glenet<sup>1</sup>, A-L Lebreil<sup>1</sup>, C Fichel<sup>2</sup>, A Marchal<sup>2,3</sup>, P Fornes<sup>1,2</sup>, F Berri<sup>1\*</sup>, L Andreoletti<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Reims Champagne Ardenne, Cardiovir EA-4684, Reims, France

<sup>2</sup> CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Pathology Department, Reims, France

<sup>3</sup> Université de Reims Champagne Ardenne, BioSpectroscopie Translationnelle EA-7506, Reims, France

<sup>4</sup> CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Virology Department, Reims, France

\*Adresses for Correspondance :

Laurent Andreoletti, MD, PhD

Laboratoire de Virologie Médicale et Moléculaire

et EA-4684 Cardiovir, Hôpital Robert Debré

Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex, France

Tel: (+33) 3 26 78 77 02

Fax: (+33) 3 26 78 41 34

Email: [landreoletti@chu-reims.fr](mailto:landreoletti@chu-reims.fr)

Or Fatma Berri, PhD,

EA-4684 Cardiovir, Université de Reims Champagne Ardenne,

51 rue Cognaq Jay, 51097 REIMS Cedex, France Email

Email: [fatma.berri@gmail.com](mailto:fatma.berri@gmail.com)

31 **Author contribution :**

32 L.A. conceived and managed the scientific project. F.B. conceived and planned the mice  
33 experimental protocols. D.C., F.B, M.G., A-L.L. and C.F. carried out the experiments. D.C.,  
34 L.A., F.B., M.G., P.F. and A.M. contributed to the interpretation of the results. D.C., L.A. and  
35 F.B. wrote the manuscript. All authors provided critical feedback and helped shape the research,  
36 analysis and manuscript.

37 **Abstract**

38 Major enterovirus B (EV-B) populations characterized by 5' terminal genomic RNA deletions  
39 ranging up to 50 nucleotides (5'TD) have been associated with the development of acute and  
40 chronic myocarditis and type 1 diabetes in mice and humans. To date dynamics of emergence  
41 of EV-B 5'TD forms and its impact on inflammatory response profile, especially on type 1 IFN  
42 response in target tissues remains unknown. In a DBA2/J mouse model of CVB3/28 infection,  
43 we found acute and chronic viral-induced damages in cardiac and pancreas tissues. In addition,  
44 using a RACE-PCR method, we found an early and sustained emergence of major 5'TD  
45 populations associated with minor full-length RNA viral forms. *In vitro* production and  
46 transfection of various synthetic CVB-3 5'TD RNA forms into human primary cardiomyocytes  
47 (HCM) demonstrated that naturally *in vivo* generated 37 to 50nt EVB-TD forms were slow  
48 replicative viruses associated with minor full-length or 8 to 36nt EVB-TD populations of helper  
49 RNAs. In the heart and pancreas, we found that IFN- $\beta$  levels were negatively correlated with  
50 proportions of 37 to 50nt EVB-TD forms and positively correlated with proportions of full-  
51 length and 8 to 36nt EVB-TD forms. Transfection of synthetic CVB-3 RNAs harboring various  
52 5'terminal deletions into HCM displayed a regulatory effect of 5'TD viral RNA forms on IFN-  
53  $\beta$  pathway induction and allowed the identification of stem loops "c" or "d" of the RNA domain  
54 I as immunomodulatory structures responsible for IFN- $\beta$  pathway induction. Overall, our  
55 results show the early emergence of major EVB-TD populations, whose proportions regulate  
56 viral genomic replication activities, and levels of type 1 IFN, a potential way to overcome  
57 antiviral immune innate host response and to lead to persistent infection of cardiac and  
58 pancreatic tissues. These results provide new insights into the role of 5'TD RNA forms as major  
59 pathophysiological factors in EV infections.

60 **Key words:** enterovirus, persistent, DBA2/J mouse, interferon, 5' terminal genomic deletion

61 **Author summary**

62 Group-B Enteroviruses (EV-B) are major causes of acute infection, such as myocarditis,  
63 pancreatitis, hepatitis or encephalitis which can evolve toward persistent infection such as  
64 dilated cardiomyopathy, type 1 diabetes or inflammatory myopathy. EV-B RNA forms with  
65 deletions in the 5'untranslated region (5'TD) were identified in acute and chronic human cardiac  
66 infection, following EV-B replication *in vitro* and in mice models. To date, dynamics of natural  
67 emergence of 5'TD EV-B forms and its impact on viral replication and type 1 interferon  
68 regulation levels remain unclear. We investigate the pathogenesis role and viral properties of  
69 naturally deleted EV-B populations in a DBA2/J mouse model. We evidenced early emergence  
70 of major EV-B 5'TD populations during acute infection which could modulate IFN- $\beta$  induction  
71 in target tissues. Transfection of synthetic CVB-3 RNA forms into cardiac target cells  
72 confirmed our results and the implication of genomic RNA domain I. These findings provide  
73 new insights into the understanding of viral mechanisms resulting in EV-B infections and open  
74 the scope for potential target immunotherapies.

75

## 76 **Introduction**

77 Group-B Enteroviruses (EV-B) are ubiquitous human pathogens transmitted through fecal-oral  
78 or respiratory routes. Although most EV-B infections remain asymptomatic, group B  
79 coxsackieviruses (CVB) serotypes 1-6 are recognized as common causes of severe acute  
80 infection in children and young adults, such as myocarditis, pancreatitis, hepatitis or meningitis  
81 [1]. Acute EV-B infections can evolve toward persistent infections such as dilated  
82 cardiomyopathy (DCM), type 1 diabetes and inflammatory myopathy [2–4].

83 EV-B are non-enveloped virus, with single-stranded positive-sense RNA genome of  
84 approximately 7,400 nucleotides [1]. EV-B RNA genome is flanked on the 5' end by a highly  
85 conserved untranslated region (5'UTR) which is crucial for the initiation of the viral replication,  
86 and translation activities [1]. In 2008, a Coxsackievirus-B2 harboring 5'terminally deleted  
87 (5'TD) populations ranging from 22 to 36 nucleotides was found in the heart of a Japanese  
88 patient who died of fulminant myocarditis [5]. In 2016, Bouin et al. identified by NGS major  
89 (95%) EV-B populations characterized by 5'UTR RNA deletions ranging from 15 to 48nt either  
90 alone or associated with low proportions (5%) of intact 5'UTR in heart biopsies from a patient  
91 with DCM [6]. In 2019, these results were confirmed by NGS investigation of explanted heart  
92 tissues from a cohort of DCM patients [7]. Similarly, major 5'TD populations have been found  
93 in persistent cardiac infection induced by a cardiovirulent CVB3 strain in a mouse model [8].  
94 These EV-B 5'TD populations were characterized by low ratios of positive to negative [(+)/(-)]  
95 RNA strands, a low production of infectious particles and low viral protein synthesis activities  
96 [6,7,9]. NGS revealed EV-B 5'TD populations with 5' terminal genomic deletions from 8 to 50  
97 nucleotides [7]. Moreover, EV-B 5'TD population has also been detected in murine pancreas  
98 at chronic stage of infection without any detectable cytopathic effect using classical culture  
99 assays [3]. These findings indicate that EV-B populations characterized by 5'TD ranging up to  
100 50 nucleotides were associated with the development of acute and chronic myocarditis and type

101 1 diabetes in mice models and humans. Moreover, these reports suggested that these EV-B  
102 5'TD forms could be early generated and selected during natural infection, and that the  
103 emergence of these low-levels replicating 5'TD populations may explain how the virus can  
104 persist in tissues long after the acute infection leading to chronic pathologies.  
105 The reported deletions within the 5'UTR of EV-B forms are known to affect functional  
106 secondary-structural elements of the RNA domain I (cloverleaf) [9–11]. Leveque et al.  
107 demonstrated the reduced genomic replicative capacity of these EV-B 5'TD RNA forms which  
108 was explained by a disturbed binding of cellular factor PCBP2 (Poly(rC)-binding protein 2)  
109 and viral factor 3CD pro (polymerase 3CD) on the 5'UTR domain I secondary structure [9].  
110 Moreover, it was evidenced that the cloverleaf domain of CVB3 RNA containing a  
111 5'triphosphate structure was sufficient to induce a type 1 IFN response as well as many pro-  
112 inflammatory cytokines by the RIG-I signalling pathway [11]. In addition, Feng et al.  
113 demonstrated that complete double-strand RNA replicative forms of EV-B were recognized by  
114 MDA5 triggering a significant type 1 IFN response in cultured human and murine cells [10].  
115 Deletions into the 5'UTR of EV-B populations could modify the RNA secondary-structural  
116 elements recognized by cytoplasmic immune sensors, such as RIG-I or MDA5 (RLRs, RIG-I-  
117 Like Receptors), resulting in a down regulation of type 1 IFN induction and promotion of an  
118 antiviral innate immune escape [12]. To date the impact of EV-B 5'TD RNA forms on  
119 inflammatory response profile and more specifically type 1 IFN induction in target tissues  
120 remains to be investigated during EV-B acute infections.  
121 In the present study, we investigated the dynamics of natural emergence of EV-B 5'TD  
122 populations and related inflammatory response profiles (IL-10, MCP1, TNF- $\alpha$  and IFN- $\beta$ )  
123 during a CVB3 induced systemic infection in a previously described DBA2/J model [13]. Using  
124 this experimental approach, we analysed the impact of EV-B 5'TD population proportions on  
125 inflammatory response profiles and more especially on type 1 IFN production levels in

126 CVB3/28-target organs with lesions during the acute phase of infection. In order to identify  
127 5'UTR viral genome structures capable of modulating type 1 IFN pathway during acute EV-B  
128 induced cell infection, various synthetic CVB3 RNA forms with progressive extending  
129 nucleotide deletions within the 5'UTR domain I (cloverleaf) structure were generated *in vitro*  
130 and transfected into cultured human primary cardiomyocytes (HCM).  
131

## 132 **Results**

### 133 **Histological lesions in main organ tissues during CVB3/28 systemic infection**

134 In order to determine which organs exhibited acute or chronic histological infectious lesions,  
135 we semi-quantified inflammatory infiltrate, necrosis and fibrosis and we performed  
136 immunohistochemistry for CD3 (T lymphocytes) and CD68 (monocytes) inflammatory cells  
137 for each tissue sampled at different days' post-infection (DPI). Massive inflammation and  
138 necrosis were found in cardiac and pancreatic tissues at 3 and 7 DPI, with a decrease until 28  
139 DPI (Fig 1A-B). Fibrosis was present only in cardiac tissues at 14 and 28 DPI. Inflammation  
140 and necrosis were present in the liver at 3 and 7 DPI without scarring after 14 DPI (Fig 1A-B).  
141 Positive CD3 and CD68 cells were found in inflammatory foci or infiltrates in the heart,  
142 pancreas and liver at 7 DPI, but not in uninfected mice (Fig 1C). CVB3/28-induced acute  
143 inflammation and necrosis consistent with an acute phase of infection was found in the heart,  
144 pancreas and liver. Lesions consistent with chronic infection were found only in cardiac and  
145 pancreatic tissues (Fig 1 and S2 Fig).

### 146 **Quantitative detection and viral properties of CVB3/28 full-length and 5'TD RNA** 147 **populations in cardiac, pancreatic and hepatic tissues**

148 We next quantified viral RNA genome copy number in target organs with lesions. At acute  
149 phase of infection, high CVB3-RNA copy levels were measured in the heart, pancreas and liver  
150 tissues with values greatly superior to the threshold of  $10^3$  genome copy (gc)/ $\mu$ g of nucleic acids  
151 extracted (Fig 2A and S1 Fig). Viral loads in these target organs with lesions exhibited a  
152 decrease until 28 DPI but remained detectable with values under or near our defined threshold  
153 (Fig 2A and S1 Fig).

154 To determine the dynamics of emergence of 5'TD viral populations in target organs with lesions  
155 of CVB3/28 infected mice, we used a previously validated RACE-PCR approach followed by

156 an on-chip capillary micro electrophoresis method (Bioanalyser Agilent®) to detect and  
157 quantify the proportions and genome copies number of each 5'TD and full-length (FL) viral  
158 populations at different DPI in the heart, pancreas and liver tissues (Fig 2B and S3 Fig B).  
159 Similarly, in the heart, pancreas and liver tissues, two populations of 5'TD viral forms were  
160 characterized: one with deletions ranging from 8 to 36 nucleotides (nt) and one with deletions  
161 ranging from 37 to 50nt. The 37 to 50nt EV-B 5'TD population was major at any DPI with  
162 significant viral load means upper than  $10^3$  cp/ $\mu$ g of nucleic acid extracted until 28 DPI in  
163 cardiac and pancreatic tissues (Fig 2B). Our results evidenced early emergence of major EV-B  
164 5'TD populations during acute infection phase without any detectable full-length RNA forms  
165 in target tissues after 14 DPI. Moreover, viral protein VP1 synthesis activities were  
166 demonstrated in target cells with decrease expression levels estimated by a semi-quantitation  
167 of IHC staining between 7 and 28 DPI (Fig 2C and S4 Fig). Progeny virus production was  
168 estimated by classical PFU assay, demonstrating a peak at 2 or 3 DPI with an absence of  
169 infectious particles detection after 14 or 28 DPI (Fig 2D).

170 To further evaluate the RNA genomic replication capacities of CVB3 populations, we  
171 determined the (+)/(-) RNA and the single/double-strand (ss/ds) viral (v) RNA Ratio in organs  
172 with lesions sampled between 3 and 28 DPI (Table 1). At 3 DPI, high (+)/(-) and ss/ds vRNA  
173 Ratio indicated classical viral genomic replication activities in target cells resulting in major  
174 genomic single-strand vRNA (Table 1). By contrast, after 14 DP, low (+)/(-) and ss/ds vRNA  
175 Ratio (<5) demonstrated disturbed viral replicative genomic activities resulting in accumulation  
176 of antigenomic and double-strand vRNA forms (Table 1) [14]. Finally, our results showed that  
177 viral RNA populations were composed mostly of single-stranded positive RNA at acute phase  
178 of infection whereas double-stranded and negative RNA forms were major after 14 DPI.  
179 Encapsidation of these viral RNA forms was assessed by challenging viral entry capacity with  
180 or without proteinase K treatment which digest all proteins, including viral proteins in the

181 sample [15]. Adding proteinase K to homogenized tissues, no viral genome copy was detected  
 182 in HeLa 229 cells, whereas without treatment we evidenced virus entry in HeLa 229 cells after  
 183 a one-hour infection (Table 1). To assess replication genomic capacities, we performed a virus  
 184 cell-culture challenge of homogenized tissues from 3, 14 and 28 DPI, in HeLa 229 cells for 72  
 185 hours (Table 1). Interestingly, fold of normalized genome copy increase was highly superior  
 186 for 3 DPI samples than for 14 and 28 DPI demonstrating high and then sustained viral genomic  
 187 replicative capacities of CVB3 5'TD populations mix (Table 1). Moreover, high levels of viral  
 188 progeny were found for 3 DPI in contrast with an absence of detectable PFU for 14 and 28 DPI  
 189 (Table 1).

190 **Table 1. Viral properties of detected EV-B populations at 3, 14 and 28 DPI**

		Heart			Pancreas			Liver		
		3	14	28	3	14	28	3	14	28
<b>Days Post Infection</b>										
<b>(+)/(-) vRNA Ratio</b>		59.8	5.0	4.8	44.9	9.2	2.0	27.2	1.8	1.2
<b>ss/ds vRNA Ratio</b>		39.4	7.0	0.4	48.2	8.4	2.9	25.8	3.3	0.4
<b>Viral cell-culture challenge (HeLa 229 cells, 72-h)</b>	<b>Entry Capacity (%)</b>	68	24	48	73	13	31	58	33	18
	<b>Proteinase K-treated Entry Capacity (%)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Fold of normalized genome copy increase</b>	587	2.5	12.1	207	4.5	9.3	389	8	5.6
	<b>PFU (PFU/ml)</b>	3*10 <sup>7</sup>	ND	ND	9*10 <sup>6</sup>	ND	ND	2*10 <sup>6</sup>	ND	ND

191 N=3; (+)/(-) or ss/ds vRNA Ratio: positive/negative or single/double-strands viral RNA Ratio. PFU:  
 192 Plaque Forming Unit Assay; ND: non-detectable.

193

194 Between 2 and 7 DPI, we evidenced high viral genomic and protein VP1 synthesis activities  
 195 associated with production of native infectious viruses in target organs with lesions (Fig 2C-  
 196 D). After 14 DPI, we showed low viral genomic replicative and protein synthesis activities  
 197 associated with an absence of a detectable viral progeny in the heart, pancreas and liver (Fig  
 198 2C-D). Finally, our results indicated that EV-B 5'TD RNA populations identified at 14 and 28  
 199 DPI were composed of partly (13 to 48%) encapsidated negative or double-strands vRNA

200 forms, whereas viral populations at 3 DPI were composed of major (58 to 73%) encapsidated  
201 positive single-strand vRNA forms (Table 1). The persistent viral forms demonstrated low  
202 replication capacities associated with an absence of detectable cytopathogenic effect using  
203 classical PFU assay (Fig 2D and Table 1).

204

#### 205 **Impact of CVB3/28 FL and 5'TD populations' proportions on replication activities**

206 To determine the impact of 5'TD and FL viral populations proportions on viral genomic  
207 replication, correlation analyzes were performed during acute phase of infection (Fig 3). We  
208 showed a significant positive correlation between proportions of full-length and 8 to 36nt 5'TD  
209 viral populations and RNA viral loads ( $R^2=0.48$ ,  $p=0.031$ ;  $R^2=0.76$ ,  $p=0.004$ ) in cardiac and  
210 pancreatic tissues, respectively (Fig 3A-B). By contrast in the same tissues, a negative  
211 correlation was evidenced between 37 to 50nt 5'TD viral form proportions and viral loads  
212 ( $R^2=0.48$ ,  $p=0.031$ ;  $R^2=0.76$ ,  $p=0.004$ ) (Fig 3A-B). In the liver, no correlation between viral  
213 population proportions and viral loads was evidenced (Fig 3C).

214 To assess the impact of 5TD RNA deletions on viral genomic replication activities, cultured  
215 human primary cardiomyocytes (HCM) were transfected with various mix of synthetic 8, 36,  
216 50nt EVB-TD RNA forms and/or FL forms mimicking proportions (respectively 20%, 20%,  
217 75% and 20%) found in mice organs with lesions. We evidenced a significant increase of viral  
218 replication levels with mix of FL, 8 or 36nt EVB-TD associated with 50nt EVB-TD forms in  
219 comparison with FL and 5'TD viral forms alone (Fig 3D). Mix of FL and 8 or 36nt EVB-TD  
220 significantly decreased viral genomic replication activities in comparison with synthetic viral  
221 RNA forms alone (Fig 3E). As displayed in Fig 3F, 5'UTR deletion groups identified in mice  
222 organs with lesions disrupt the functional secondary structures of RNA domain I (cloverleaf)  
223 by the loss of stem "a" (8nt) and stems-loops "b" (36nt), "c" and part of "d" (50nt) which are

224 essential for the binding of host proteins (such as PCBP) or viral factors (such as 3CD) of viral  
225 replication complexes.

226

227 **Inflammatory response Th-1 profile in cardiac, pancreatic and hepatic tissues during**  
228 **acute CVB3/28 infection**

229 In order to determine the inflammatory response profile during the course of myocarditis in  
230 CVB3/28-infected DBA/2J mice, we performed ELISA assays on homogenized cardiac  
231 samples at acute stage of infection (2-7 DPI). In cardiac tissues of infected mice, CVB3/28  
232 infection induced a strong and sustained Th1 inflammatory cytokines production, such as IL-  
233 10, TNF- $\alpha$  and MCP1 (Fig 4A-C). By contrast, IFN- $\beta$  levels experienced a slight significant  
234 increase at 2 and 3 DPI, and a decrease at 7 DPI (Fig 4D). By contrast, inflammatory response  
235 in the liver was weak with no MCP-1 increase explaining the absence of a chronic hepatitis  
236 associated with a potential long-term viral clearance (Fig 4A-D). Several organs without lesions  
237 exhibited different inflammatory response profile, including IL-10 levels decrease (for the  
238 spleen, intestines and lungs tissues) associated with MCP1 levels increase and no TNF- $\alpha$  nor  
239 IFN- $\beta$  levels increase for all of these (S5 Fig).

240

241 **Correlation between CVB3/28 FL and 5'TD populations' proportions and IFN- $\beta$  levels**

242 In order to investigate the impact of 5'TD and FL viral population proportions on IFN- $\beta$  levels,  
243 correlation analyzes were performed at acute phase of infection (Fig 5). We showed a  
244 significant positive correlation between proportions of full-length and 8 to 36nt 5'TD viral  
245 populations and IFN- $\beta$  levels ( $R^2=0.55$ ,  $p=0.014$ ;  $R^2=0.65$ ,  $p=0.01$ ) in the heart and pancreas  
246 tissues respectively (Fig 5A-B). By contrast in the same tissues, a negative correlation was  
247 evidenced between 37 to 50nt 5'TD viral form proportions and IFN- $\beta$  levels ( $R^2=0.55$ ,  $p=0.014$ ;

12

248  $R^2=0.65$ ,  $p=0.01$ ) (Fig 5A-B). In the liver, no correlation between viral population proportions  
249 and IFN- $\beta$  levels were evidenced (Fig 5C).

250

251 **IFN- $\beta$  mRNA and cytokine secretion by human primary cardiomyocytes transfected with**  
252 **full-length or CVB3/28 5'terminally deleted RNA forms.**

253 Since deletions of 37 to 50nt in the 5'termini part of EV-B RNA forms were associated with a  
254 down regulation of IFN- $\beta$  levels in cardiac murine tissues, a key biological issue was to identify  
255 5'UTR secondary-structural elements capable of modulating innate immune response (Fig 6).  
256 Undeleted (FL) and 8 to 100nt deleted CVB-3/28 genomic RNAs were cloned and *in vitro*  
257 transcribed. Cultured HCM were transfected with synthetic FL or each of the EV-B 5'TD RNA  
258 forms.

259 First, our synthetic various CVB3-RNAs were checked for the absence of 5'tri-phosphate  
260 group and for the presence of major single-strand viral RNA (ssRNA) structures respectively  
261 by Antarctic phosphatase (AnP) and RNase A treatments (Fig 6A-B). Our synthetic CVB3-  
262 RNA forms were ssRNA structures without 5'tri-phosphate groups and were therefore unable  
263 to induce a non-specific type 1 IFN response via RIG-I pathway activation in target cells (Fig  
264 6A)[16]. HCM transfection of synthetic CVB3/28 FL and CVB3/28 5'TD RNA forms with  
265 deletions ranging from 8 to 36nt induced significantly higher levels of IFN- $\beta$  mRNA than those  
266 found with CVB3/28 TD50 and TD100 forms ( $p<0.01$ ), whereas no difference was found  
267 between CVB3/28 5'TD RNA forms with deletions ranging from 8 to 36nt (Fig 6C).  
268 Consistently, correlation analyses of IFN- $\beta$  mRNA levels with those of antiviral genes regulated  
269 by IFN- $\beta$ , such as interferon-stimulated genes 56 (ISG56), at 8 hours' post-transfection revealed  
270 a significant activation of IFN- $\beta$  signaling for the two groups of 5'TD viral populations that  
271 were previously identified in heart tissues of CVB3-infected mice (Fig 6D-E). IFN- $\beta$  cytokine  
272 level was quantified in the supernatant of HCM transfected by our synthetic CVB3/28 RNA

13

273 forms and confirmed significant variations of IFN- $\beta$  mRNA levels described for the CVB3/28  
274 TD50 and TD100 forms (Fig 6F). Secondary-structural elements of the 5'UTR are depicted in  
275 Fig 3F indicating that stem-loop "c" and stem-loop "d" were located between 36 and 80nt.  
276 Complete or partly loss of these two secondary-structure elements could explain the low  
277 capacity of *in vitro* synthesized TD50 and TD100 forms to induce IFN- $\beta$  mRNA and cytokine  
278 production. These results indicated that stem loops "c" or "d" of the viral RNA domain I  
279 (cloverleaf) were essential EV-B genomic structures responsible for IFN- $\beta$  pathway induction  
280 in human cardiac cells.  
281

## 282 **Discussion**

283 In the present study, we investigated how natural deletions within the 5'UTR affecting the  
284 secondary-structural elements of the genomic RNA domain I (cloverleaf) can modulate EV-B-  
285 related inflammatory response profile in target tissues with lesions during a CVB3-induced  
286 mice systemic infection. We evidenced an unexpected early emergence of major 37 to 50nt EV-  
287 B 5'TD populations during acute phase of infection whose high proportions can down regulate  
288 type 1 IFN response in cardiac and pancreatic tissues of CVB3-infected DBA2/J mice.  
289 Subsequently, synthetic CVB-3 RNAs harboring 5'terminal progressive extending deletions  
290 were generated *in vitro* and transfected into cultured human primary cardiomyocytes (HCM).  
291 This cellular model confirmed the significant direct down regulating effect of major 37 to 50nt  
292 EV-B 5'TD RNA forms on IFN- $\beta$  pathway induction. Moreover, this *in vitro* strategy allowed  
293 the identification of stem-loops "c" or "d" of the viral RNA domain I (cloverleaf) as essential  
294 EV-B genomic structures responsible for IFN- $\beta$  pathway induction including antiviral genes  
295 such as interferon-stimulated genes 56 (ISG56).

296

297 We investigated dynamics of emergence of EV-B 5'TD and full-length populations in mouse  
298 tissues (Fig 1). RNA-dependent RNA polymerase errors and lack of proofreading are likely to  
299 explain early generation of 37-50nt EV-B 5'TD RNA forms in all study organs (Fig 2B) [17].  
300 We found that proportions of 37-50nt EV-B 5'TD populations were negatively correlated with  
301 the total EV RNA levels in tissues with lesions, therefore the viral genomic replication  
302 capacities of these 5'TD RNAs were investigated by transfection of synthetic CVB RNAs in  
303 cultured cardiac cells (Fig 3A-B) [7]. As others, our experiments evidenced that these viral  
304 forms were low-level replicating viruses whose sustained genomic replication activities in  
305 target cells would result from molecular cooperation mechanisms with other viral RNA  
306 populations (Fig 3D-E) [18]. Full-length or 8-36nt EV-B 5'TD viruses could act as helper virus,

307 allowing 37-50nt EV-B 5'TD forms to replicate by providing the elements necessary for their  
308 replication in trans or through genomic recombination events (Fig. 3D) [19,20]. EV-B 5'TD  
309 viral forms associated with full-length viruses could reproduce *in vivo* a mode of viral  
310 replication that was reported to occur in cell culture via defective interfering (DI) particles [21].  
311 By contrast, self-replicative 8-36nt EV-B 5'TD viruses could hijack viral or cellular host factors  
312 of viral ribonucleoprotein (RNP) complexes, thereby decreasing full-length virus genomic  
313 replication activities (Fig. 3E-F).

314

315 Major sustained proportions of 5'TD viral populations associated with minor or undetectable  
316 full-length viral forms were detected only in target organs with histological lesions, whereas  
317 proportions of full-length and 5'TD forms were found similar and were transiently detected in  
318 target organs with no lesion. These results suggested an evolutionary advantage of 5'TD RNA  
319 forms in specific host cell conditions (Fig 2B and S3 Fig B). Differences in cell-type distribution  
320 and replication dynamics of EV-B populations could be explained by various expression levels  
321 of replication complex cellular factors such as hnRNP C (Heterogeneous Ribonucleoprotein  
322 Particle). Their low levels could provide an evolutionary advantage to 5'TD RNA forms over  
323 hnRNP C-dependent full-length RNA forms replication, thereby enabling them to become  
324 dominant virus populations in cardiomyocytes and pancreatic islets beta cells (Fig 2B) [22]. It  
325 is well established that the host protein hnRNP C can bind the 5'termini of full-length poliovirus  
326 negative-strand RNA intermediates promoting the synthesis of positive-strand EV RNAs  
327 [23,24]. The 5' terminal deletions of positive-strand RNAs ranging from 37 to 50nt would  
328 reduce the binding of hnRNP C to negative strand RNAs [23,25]. Loss of such positive viral  
329 RNA binding might contribute to the significant reduction of positive strand RNA synthesis  
330 and aberrant low (+)/(-) vRNA ratios as found in murine tissues chronically infected by major  
331 5'TD viral populations (Table 1 and Fig 2) [25,26]. Such a scenario might explain an

332 accumulation of 5'TD double-strand and negative vRNAs in cardiac and pancreatic tissues from  
333 14 DPI (Table 1). Consequently, hijacking of viral or cellular host factors of RNP complexes  
334 by major levels of 5'TD anti-genomic vRNA forms could significantly impair genomic  
335 replication activities of minor full-length RNA forms explaining why they are undetectable  
336 from 14 to 28 DPI in the heart and pancreas (Fig 2B). Overall, our results strongly suggest that  
337 hnRNP C or other unknown host proteins of RNP complexes formed with the 3' ends of  
338 negative-strand could provide an early replicative advantage to the 5'TD viral forms in specific  
339 cells [9,22,25]. Our further studies will aim at identifying specific host cell proteins in full-  
340 length and 5'TD EV-B replication nucleotide complexes. A genome wide CRISPR–Cas9  
341 screen in near haploid human HAP1 cells approach could uncover differences between host  
342 proteins factors crucial for infection and replication of EV-B full-length and 5'TD forms in  
343 human target cells [27]. Identification of new cell host proteins of viral RNP complexes could  
344 help in designing new therapeutic strategies either targeting or inhibiting host protein activities  
345 involved in full-length or EV-B 5'TD RNA replication [28,29].

346

347 We identified different Th1 inflammatory response profiles in CVB3 target organs with or  
348 without histological lesions (Fig 4 and S5 Fig). Significant MCP1, TNF- $\alpha$  and IL-10 levels  
349 increased in tissues with lesions could be early mediated in a TLR3-dependant manner and be  
350 responsible for inflammatory cells recruitment and infected-cell-induced apoptosis (Fig 1)  
351 [30,31]. Sustained IL-10 and MCP1 high levels found in cardiac and pancreatic tissues have  
352 been shown to exert an immunosuppressive activity and promote a Th2 inflammatory response  
353 switch resulting in an altered immune modulatory response and a potential persistent viral  
354 infection [32,33]. Remarkably, no significant IFN- $\beta$  levels increase was evidenced at acute  
355 phase of infection in all target organs (Fig 4D and S5 Fig). The innate immune response  
356 mediated by type 1 IFN is a key step in the progression of acute viral infection, which may  
357 evolve toward either healing or chronic infection [34]. The importance of this system is

17

358 evidenced by the variety of mechanisms used by RNA (+) viruses to evade or inhibit IFN  
359 induction, signaling or effector functions and by the various deleterious phenotypes found in  
360 humans and mice with genetic disruptions in IFN- $\beta$  production or signaling [31,35,36].  
361 Interestingly, mutations within the 5'UTR affecting the secondary-structural elements of  
362 alphavirus genomic RNA, which are also positive-strand RNA viruses, are known to modulate  
363 replication and to alter interferon-stimulated protein binding and functions [37]. Moreover,  
364 Hepatitis C Virus (HCV) defective variants quasispecies have also been described resulting  
365 from high replication rates and an intrinsic lack of proofreading by HCV RNA-dependent RNA  
366 polymerase, thereby contributing to an immune system evasion [38].

367

368 We showed for the first time that 8-36nt, 37-50nt EV-B 5'TD and full-length populations  
369 proportions could modulate IFN- $\beta$  levels in target tissues. We found different patterns of 5'TD  
370 population's distribution between CVB3-infected organs with or without lesions, suggesting  
371 that modified 5'UTR RNA secondary-structures could avoid immune restriction by low type 1  
372 IFN secretion and ISG transcription levels. This could result from a differential qualitative  
373 binding of 5'terminally deleted EV-B RNA sequences to the RLRs (RIG-I or MDA5) acting as  
374 major innate immune sensors for EV-B, possibly in a LGP2-dependant manner [10–12].  
375 Modulation of RLRs activation by 5'terminal RNA structures of EV-B 5'TD viruses could  
376 impair type 1 IFN pathway activation, thus modulating IFN- $\beta$  and ISG transcription and  
377 translation levels in infected cells, a potential way to overcome antiviral immune innate host  
378 response and to lead to the development of sub-acute (14 DPI) and persistent (28 DPI) infection  
379 of cardiac and pancreatic tissues (Fig 1, 5 and 7). In order to understand the structural link  
380 between RNA domain I structures and IFN- $\beta$  pathway induction, we investigated the direct  
381 impact of the RNA domain I structures on IFN- $\beta$  and ISG56 mRNA expression. Using a  
382 strategy based on the transfection of synthetic 5' terminally modified viral RNAs into human

383 cardiac cells, we identified stem-loops “c” or “d” of the viral RNA domain 1 (cloverleaf) as  
384 essential viral genomic structures responsible for IFN- $\beta$  pathway induction including antiviral  
385 genes such as ISG56 (Fig 6). To date, whether the RLRs recognition is dependent of RNA  
386 sequences or secondary structures remains unknown. We are currently addressing this question  
387 by generating synthetic full-length forms specifically deleted within the stem-loops “c” or “d”  
388 of EV-B RNA domain I. Moreover, we aim to further determine the major intra cytoplasmic  
389 innate immune sensor (RIG-I or MDA5) responsible for EV-B 5’UTR detection using  
390 overexpressing and knock-out HEK293T cells for each RLRs and to identify viral sequences  
391 and RNA secondary-structures that specifically interact with RIG-1 or MDA5 [39].

392

393 Overall, our results show the early emergence of major EV-B 5’TD populations whose  
394 proportions modulate viral genomic replication activities and levels of type 1 IFN, a potential  
395 way to overcome antiviral immune innate host response and to lead to persistent infection of  
396 the heart and pancreas (Fig 7). Our experimental findings provide important new insights into  
397 the role of 5’TD RNA forms as major key pathophysiological factors in EV acute infection of  
398 target cells. Further experimental and clinical investigations are needed to confirm our present  
399 results and to assess the pathophysiological role of 5’TD populations in EV human infections.  
400 Deciphering the molecular mechanisms leading to the early emergence of 5’TD viral forms in  
401 EV acute infections would enable the development of target immunotherapies to re-establish  
402 an efficient antiviral innate immune response and potentially to achieve a viral clearance of  
403 target cells.

404

405 **Material and methods**

406 **Cells, virus strain and reagents**

407 Hela cells were grown in minimum essential media (MEM) supplemented by 5ml Penicillin-  
408 streptomycin (PS) (Gibco<sup>®</sup>, France), 5ml L-Glutamine and 10% Fetal Bovin serum (FBS)  
409 (ThermoFisher<sup>®</sup>, France). Human primary CardioMyocytes (HCM, ScienCell Research  
410 Laboratories<sup>®</sup>) were cultured in cardiac myocyte medium supplemented with 5% FBS  
411 (ScienCell Research Laboratories<sup>®</sup>) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cardiac myocyte cell cultures were  
412 passaged twice a week and the cells were harvested between passages 3 to 9. CVB3/28 virus  
413 strain was gift from Steve Stracy (University of Nebraska Nincoln, USA) [40]. IL-10, MCP1,  
414 TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$  were purchased from R&D Systems<sup>®</sup>.

415 **Virus production and titration**

416 Hela cells were seeded at  $0.8 \times 10^6$  cell per well of tissue culture platelet (6 wells) and then  
417 incubated at 37°C overnight. The next day, cell confluence was evaluated at  $1.5 \times 10^6$  cell per  
418 well, based on previous experience, cells were then infected with CVB3/28 at a multiplicity of  
419 infection (MOI) of  $10^{-3}$  in free-serum MEM. After 48 hours' post-infection, the supernatant was  
420 collected and then clarified using low-speed centrifugation, virus particles were then measured  
421 by plaque-forming-unit assay (PFU). Briefly, Hela cells were infected with CVB3/28, making  
422 serial dilutions, for 1h at 37°C. After viral adsorption, the inoculum was harvested, and cells  
423 were overlaid with medium containing 2% agarose and incubated at 37°C. After 3 days, viral  
424 plaques were visualized using bromophenol blue staining. The viral titers were expressed as  
425 plaque forming unite per 1 ml (PFU/mL). The deleted 5' UTR viral sequences were obtained  
426 using a two-step PCR approach to delete the 5' nucleotides and add a hammer-head ribozyme  
427 upstream of the viral sequence. The 5' TD viral RNAs were synthesized using a MEGAscript™

428 T7 Transcription Kit (Invitrogen<sup>®</sup>) and purified using a MEGAclear<sup>™</sup> Transcription Clean-Up  
429 Kit (Invitrogen<sup>®</sup>).

#### 430 **Ethic statement**

431 Experiments were performed according to recommendations of the “National Commission of  
432 Animal Experiment (CNEA)” and the “National Committee on the Ethic Reflexion of Animal  
433 Experiments (CNREEA)”. The protocol was approved by the committee of animal experiments  
434 of the Reims Champagne-Ardenne (accreditation number 56) and then by Ministry of Advanced  
435 Education and research (permit number #5463-201704171500306). All efforts were made to  
436 minimize suffering in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals  
437 of the Direction des Services Vétérinaires, the French regulations to which our animal care and  
438 protocol adhered.

#### 439 **Mice infection**

440 Five-week-old male DBA/2J mice, purchased from Charles River laboratory<sup>®</sup> (France), housed  
441 under pathogen free condition, were infected intraperitoneally with 10<sup>6</sup> PFU/mice in 150µl of  
442 physiological serum, uninfected mice were inoculated with 150µl of physiological serum. To  
443 determine survival rates upon infection, loss of body weight was monitored daily for 28 days’  
444 post-infection and mice were euthanized if they had ≥ 20% loss of their initial body weight,  
445 according to our protocol. Before intra-cardiac blood collection, mice were anesthetized with  
446 Ketamine/Xylazin (42.5/5 mg/kg) and euthanized by cervical dislocation before organs  
447 collection at various pre-fixed times points post-infection (2, 3, 7, 14, and 28 days post-  
448 infection, DPI).

#### 449 **Histology and immunohistochemistry**

450 Infected or uninfected mice were sacrificed at the indicated times, a complete autopsy was  
451 performed and organs samples including heart, pancreas, liver, brain, lungs, intestine, spleen,

452 muscle were taken and fixed in formaldehyde 4% for histology. Hearts were sliced into three  
453 transverse biventricular sections as recommended for the diagnosis of myocarditis [41]. For  
454 each sample, four- $\mu$ m-thick paraffin sections were cut at 3 levels. The slides were stained with  
455 Hematoxylin, Eosin and Safran (HES). The slides were examined by a pathologist for cellular  
456 infiltration, fibrosis, and necrosis. The lesions were graded using a scale of 0 (no necrosis,  
457 inflammation, or fibrosis), 1 (1 or 2 foci by slice), 2 (1 or 2 foci on every slice) to 3 (more than  
458 2 foci on every slice). In addition, immunostaining was performed for CD3 (1/1000; Dako  
459 A0452), CD68 (1/100; Dako, M0814) and VP1 (1/1000; Dako, 5D8/1) as previously described  
460 [13,42].

#### 461 **Total RNA isolation and qRT-PCR**

462 The homogenized tissues were subjected to digestion with proteinase K (Merck®). Total RNA  
463 was isolated with TRIzol RNA Isolation Reagents® (ThermoFisher®, France) method according  
464 to the manufacturer's instructions. RNA were stored at -80°C. Viral RNA copy number was  
465 quantified by RT-quantitative PCR with a StepOne plus realtime PCR system (ThermoFisher  
466 Scientific®) as described previously, using primers amplifying the CVB3/28: sense (5'-CAC  
467 ACT CCG ATC AAC AGT CA-3'), antisense (5'-GAA CGC TTT CTC CTT CAA CC-3') and  
468 probe FAM/TAMRA (5'-CGT GGC ACA CCA GCC ATG TTT-3') (Eurogentec®)[14].

#### 469 **Rapid amplification of cDNA ends-PCR (RACE PCR).**

470 Viral RNA (200 ng) were reverse transcribed using Superscript II kit (Invitrogen,  
471 ThermoFisher®) with 400nM AvCRev and was incubated 5min at 65°C and then 5min on ice.  
472 The 5'extremity of cDNA was then ligated with 1X T4 DNA ligase buffer (Ambion,  
473 ThermoFisher®), 50nM Trp1 DNA adaptor, 5 units of Ambion® T4 DNA Ligase (Ambion,  
474 ThermoFisher®) was added to the cDNA-mix and was incubated 24 hours at 16°C[6]. Positive  
475 cDNA was amplified by a classical PCR reaction using KAPA Taq polymerase kit consisting  
476 of 1X KAPA TaqA buffer, 200 $\mu$ M dNTPs, 400nM AvCRev, 400nM Trp1, 1U KAPA Taq

477 polymerase in a mix of 25µL with a cycling process composed of one cycle for 3min at 95°C,  
478 40 cycles of 30s at 95°C, 30s at 55°C, 30s at 72°C, finishing in a cycle of 30s at 72°C. A 2%  
479 agarose gel electrophoresis was performed in order to control the length of the PCR products.  
480 Amplicons were then sized and quantified by Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analyses  
481 using Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent®) according to the manufacturer's  
482 instructions. Viral populations deleted from less than 8 nucleotides were considered as full-  
483 length viral populations.

#### 484 **Positive and Negative-Strand RNA Ratio**

485 Negative-strand RNA was isolated from total RNA molecules by annealing a biotinylated  
486 negative-strand specific primer (E3REV; 5'-GGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTG-3')  
487 and binding to streptavidin-labeled magnetic beads (Invitrogen®, Life Technologies, Saint-  
488 Aubin, France). Purified negative-strand and total viral RNA molecules were quantified with a  
489 One-Step real-time RT-PCR assay using serial dilutions of the transcripts for the generation of  
490 the standard curves. The positive to negative strand viral RNA ratio was then determined using  
491 the following calculation: (total EV RNA – negative strand EV RNA)/negative strand EV  
492 RNA[14].

#### 493 **Single and Double-Strand RNA Ratio**

494 Double-strand EV-B RNA was isolated by digesting single-strand RNA with recombinant  
495 bacterial RNase A (ThermoScientific®)[43]. A mix of 200ng of total RNA with 1µl of RNase  
496 and buffer solution of NaCl at 0.3M, were incubated 10min at 25°C. Double-strand viral RNA  
497 copy number was quantified with a One-Step real-time RT-PCR assay using serial dilutions of  
498 the transcripts for the generation of the standard curves. The single-strand to double-strand viral  
499 RNA ratio was then determined using the following calculation: (total EV RNA – double-strand  
500 EV RNA)/double-strand EV RNA.

501 **72-hour cell culture viral challenge on HeLa 229**

502 HeLa cells were seeded at  $1,5 \times 10^5$  cells per well of tissue culture platelet (24 wells) and then  
503 incubated at 37°C overnight. The next day, cell confluence was evaluated, based on previous  
504 experience, and cells were infected with 300 µl of diluted (1/10 to 1/20) heart, pancreas and liver  
505 homogenized tissues supernatants, for 1h at 37°C. After viral adsorption, the inoculum was  
506 harvested, and cells were overlaid with free-serum MEM and incubated at 37°C. After 72 hours,  
507 supernatant and cells were harvested separately. Viral loads and titers were measured as  
508 described above.

509 **Transfection**

510  $2.0 \times 10^5$  cells HCM per well were seeded in 24-well plates (Nunclon delta surface, Thermo  
511 Scientific®). The plates were incubated overnight at 37°C. Cells were washed with DPBS and  
512 400 µl of Opti-MEM GlutaMAX (Thermo Scientific®) was added. The transfection mixtures  
513 (0.1 mL) consisted of 1000 ng of synthetic RNA and 1 µl of Lipofectamine 2000 (Thermo  
514 Scientific®) in Opti-MEM Glutamax. The mixtures were incubated for 25 min at room  
515 temperature. Then 100 µl of the mixture was added to the cells, and plates were transferred to  
516 a cell incubator at 37°C for 2 hours (IFN-β and ISG56) or 24 hours (viral loads measurement  
517 as described above). The supernatants were collected, and the cells lysed by 500 µL of TRI  
518 Reagent® (Sigma–Aldrich Corporation, Lyon, France).

519 **Cytokines quantification**

520 Organs of euthanized mice were harvested, at the indicated times post-infection, homogenized  
521 in 600 µl of PBS solution with TissueLyser LT (QIAGEN®, France), and centrifuged at 12 000  
522 rpm for 15 min at 4°C. The supernatant was used for: 1) measurement of cytokines by Enzyme-  
523 Linked Immunosorbent assay (R&D Systems®, France), 2) virus particles determination as  
524 described above. Viral titers were expressed as plaque forming unit per 1 mg of total protein

525 (PFU/mg). Measurement of total protein concentration in each supernatant was performed by  
526 the Bicinchoninate Acid Method (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, France) according to the manufacturer's  
527 instructions. Cytokine protein level was expressed as pg or ng/mg of total protein by calculating  
528 the ratio cytokine concentration/total protein concentration.

529 For the quantitative determination of human IFN- $\beta$  concentrations in cell culture supernatants,  
530 ELISA assays using commercially available VeriKine Human IFN Beta ELISA kits (R&D  
531 Systems<sup>®</sup>, France) were performed according to the manufacturer's instructions.

### 532 ***In vitro* dephosphorylation assays**

533 The dephosphorylation of synthetic RNAs was carried out using Antarctic phosphatase (10  
534 U), 1X Antarctic Phosphatase buffer (New England BioLabs GmbH<sup>®</sup>, Frankfurt, Germany) and  
535 2  $\mu$ g of synthetic RNAs in a 20  $\mu$ L final volume for 1h at 37°C. Enzymes were deactivated at  
536 80°C for 2 min. RNAs quality was controlled by loading 8  $\mu$ L of each controls and  
537 dephosphorylation products by electrophoresis on 1% agarose gel.

### 538 **Reverse transcription-quantitative PCR using SybrGreen<sup>®</sup> (RT-qPCR)**

539 RNA was extracted from cultured cells with TRIzol Reagent<sup>®</sup> (Invitrogen, Life Technologies)  
540 and reverse transcribed using SuperScript<sup>™</sup> II Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen Life  
541 Technologies<sup>®</sup>) following to the manufacturer's instructions. cDNA was subjected to PCR  
542 using PowerUp<sup>™</sup> SYBR<sup>™</sup> Green Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific<sup>®</sup>) to detect IFN-  
543  $\beta$  and ISG56 expression. The primers used for PCR detection as follows: for human IFN- $\beta$ ,  
544 forward primer 5'-AGCTGAAGCAGTTCCAGAAG-3' and reverse primer 5'-  
545 AGTCTCATTCCAGCCAGTGC-3'; human ISG56, forward primer 5'-  
546 TCCCCTAAGGCAGGCTGTC-3' and reverse primer 5'-  
547 GACATGTTGGCTAGAGCTTCTTC-3'. Primers specific to glyceraldehyde-3-phosphate  
548 dehydrogenase (GAPDH) (forward primer 5'AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3' and reverse

549 primer 5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3') was served as the internal control. PCR was  
550 carried out in StepOnePlus Real-Time PCR Systems (ThermoFisher Scientific<sup>®</sup>) programmed  
551 as follows: denaturation step at 94°C for 15s, annealing step at 63°C for 10 s, and extension  
552 step at 72°C for 15 s for a total of 40 cycles, before melting curve. Results were analyzed by  
553 the  $\Delta\Delta$ CT method, where CT is threshold cycle, and normalized to GAPDH mRNA. Data are  
554 represented as levels of mRNA relative to that of the mock transfected control samples and are  
555 displayed as the means  $\pm$  SD of results from at least three independent experiments.

### 556 **Statistical analysis**

557 Mann-whitney's test was used for organs viral data, *in vitro* viral data and ELISA results and  
558 Kaplan-Meier test to assess the statistical analysis for survival rates. Spearman correlation test  
559 was performed. The observed differences were considered significant when P values < 0.05.  
560 The number (n) of animal used in the experiment is specified in figure legend. All statistical  
561 analyses were performed using GraphPad Prism 7 (Prism<sup>®</sup>)

562

563 **Acknowledgments**

564 We thank the laboratory animal house of the Faculty of Pharmacy and Medicine (URCA,  
565 Reims). We thank Nicole Bouland (Pathology Laboratory, URCA, Reims) for her precious help  
566 in histology and immunohistochemistry methods. We thank Dr Paul-Antoine Gretteau for his  
567 skillful assistance in designing the graphical abstract.

568

569 **Bibliographic references**

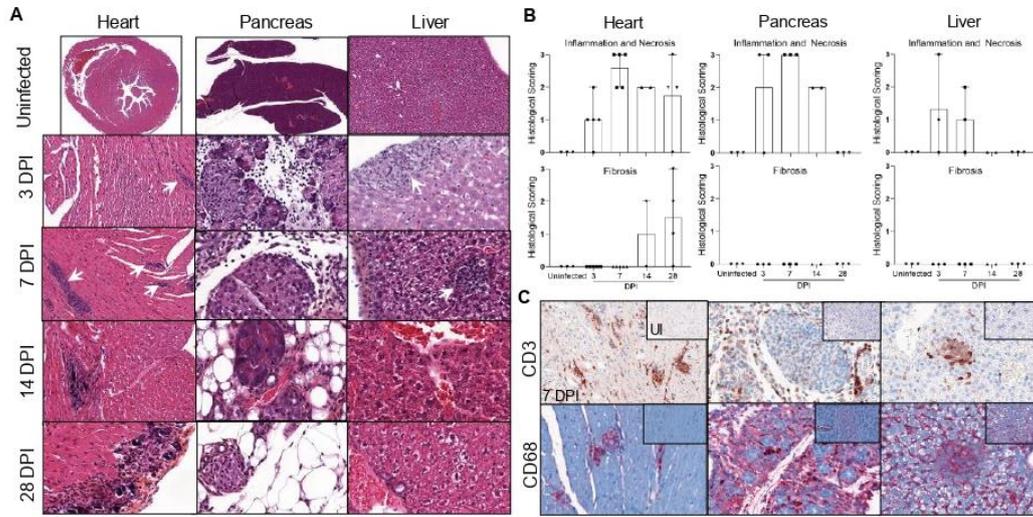
- 570 1. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio  
571 enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16: 368–381.  
572 doi:10.1038/s41579-018-0005-4
- 573 2. Genoni A, Canducci F, Rossi A, Broccolo F, Chumakov K, Bono G, et al. Revealing  
574 enterovirus infection in chronic human disorders: An integrated diagnostic approach. *Sci*  
575 *Rep.* 2017;7: 5013. doi:10.1038/s41598-017-04993-y
- 576 3. Tracy S, Smithee S, Alhazmi A, Chapman N. Coxsackievirus can persist in murine  
577 pancreas by deletion of 5' terminal genomic sequences: Coxsackievirus Persistence in the  
578 Pancreas. *J Med Virol.* 2015;87: 240–247. doi:10.1002/jmv.24039
- 579 4. Tam PE, Fontana DR, Messner RP. Coxsackievirus B1–induced chronic inflammatory  
580 myopathy: differences in induction of autoantibodies to muscle and nuclear antigens by  
581 cloned myopathic and amyopathic viruses. *J Lab Clin Med.* 2003;142: 196–204.  
582 doi:10.1016/S0022-2143(03)00108-2
- 583 5. Chapman NM, Kim K-S, Drescher KM, Oka K, Tracy S. 5' terminal deletions in the  
584 genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. *Virology.*  
585 2008;375: 480–491. doi:10.1016/j.virol.2008.02.030
- 586 6. Bouin A, Nguyen Y, Wehbe M, Renois F, Fornes P, Bani-Sadr F, et al. Major Persistent  
587 5' Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in Human Endomyocardial Tissues.  
588 *Emerg Infect Dis.* 2016;22: 1488–1490. doi:10.3201/eid2208.160186
- 589 7. Bouin A, Gretteau P-A, Wehbe M, Renois F, N'Guyen Y, Leveque N, et al. Enterovirus  
590 Persistence in Cardiac Cells of Patients Suffering From Idiopathic Dilated  
591 Cardiomyopathy is Linked to 5' Terminal Genomic RNA-Deleted Viral Populations With  
592 Viral-Encoded Proteinase Activities. *Circulation.* 2019 [cited 25 Feb 2019].  
593 doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035966
- 594 8. Kim K-S, Tracy S, Tapprich W, Bailey J, Lee C-K, Kim K, et al. 5'-Terminal Deletions  
595 Occur in Coxsackievirus B3 during Replication in Murine Hearts and Cardiac Myocyte  
596 Cultures and Correlate with Encapsidation of Negative-Strand Viral RNA. *J Virol.*  
597 2005;79: 7024–7041. doi:10.1128/JVI.79.11.7024-7041.2005
- 598 9. Lévêque N, Garcia M, Bouin A, Nguyen JHC, Tran GP, Andreoletti L, et al. Functional  
599 Consequences of RNA 5'-Terminal Deletions on Coxsackievirus B3 RNA Replication and  
600 Ribonucleoprotein Complex Formation. Pfeiffer JK, editor. *J Virol.* 2017;91.  
601 doi:10.1128/JVI.00423-17
- 602 10. Feng Q, Hato SV, Langereis MA, Zoll J, Virgen-Slane R, Peisley A, et al. MDA5 detects  
603 the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep.*  
604 2012;2: 1187–1196. doi:10.1016/j.celrep.2012.10.005
- 605 11. Feng Q, Langereis MA, Olagnier D, Chiang C, van de Winkel R, van Essen P, et al.  
606 Coxsackievirus Cloverleaf RNA Containing a 5' Triphosphate Triggers an Antiviral  
607 Response via RIG-I Activation. Thiel V, editor. *PLoS ONE.* 2014;9: e95927.  
608 doi:10.1371/journal.pone.0095927

- 609 12. Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-  
610 I and MDA5. *Front Immunol.* 2014;5. doi:10.3389/fimmu.2014.00342
- 611 13. Andréoletti L, Hober D, Becquart P, Belaich S, Copin MC, Lambert V, et al. Experimental  
612 CVB3-induced chronic myocarditis in two murine strains: evidence of interrelationships  
613 between virus replication and myocardial damage in persistent cardiac infection. *J Med*  
614 *Viro.* 1997;52: 206–214.
- 615 14. Lévêque N, Renois F, Talmud D, Nguyen Y, Lesaffre F, Boulagnon C, et al. Quantitative  
616 Genomic and Antigenomic Enterovirus RNA Detection in Explanted Heart Tissue  
617 Samples from Patients with End-Stage Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J Clin*  
618 *Microbiol.* 2012;50: 3378–3380. doi:10.1128/JCM.01612-12
- 619 15. Roder AE, Homer SM. Measuring Hepatitis C Virus Envelopment by Using a Proteinase  
620 K Protection Assay. In: Law M, editor. *Hepatitis C Virus Protocols.* New York, NY:  
621 Springer New York; 2019. pp. 209–217. doi:10.1007/978-1-4939-8976-8\_14
- 622 16. Feng Q, Langereis MA, Olganier D, Chiang C, van de Winkel R, van Essen P, et al.  
623 Cocksackievirus cloverleaf RNA containing a 5' triphosphate triggers an antiviral response  
624 via RIG-I activation. *PLoS One.* 2014;9: e95927. doi:10.1371/journal.pone.0095927
- 625 17. Peersen OB. Picornaviral polymerase structure, function, and fidelity modulation. *Virus*  
626 *Res.* 2017;234: 4–20. doi:10.1016/j.virusres.2017.01.026
- 627 18. Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation between different variants: A unique  
628 potential for virus evolution. *Virus Res.* 2019;264: 68–73.  
629 doi:10.1016/j.virusres.2019.02.015
- 630 19. Holmblat B, Jégouic S, Muslin C, Blondel B, Joffret M-L, Delpeyroux F. Nonhomologous  
631 Recombination between Defective Poliovirus and Cocksackievirus Genomes Suggests a  
632 New Model of Genetic Plasticity for Picornaviruses. Racaniello V, editor. *mBio.* 2014;5:  
633 e01119-14. doi:10.1128/mBio.01119-14
- 634 20. Muslin C, Joffret M-L, Pelletier I, Blondel B, Delpeyroux F. Evolution and Emergence of  
635 Enteroviruses through Intra- and Inter-species Recombination: Plasticity and Phenotypic  
636 Impact of Modular Genetic Exchanges in the 5' Untranslated Region. Lauring A, editor.  
637 *PLoS Pathog.* 2015;11: e1005266. doi:10.1371/journal.ppat.1005266
- 638 21. Vignuzzi M, López CB. Defective viral genomes are key drivers of the virus–host  
639 interaction. *Nat Microbiol.* 2019;4: 1075–1087. doi:10.1038/s41564-019-0465-y
- 640 22. Kamma H, Portman DS, Dreyfuss G. Cell Type-Specific Expression of hnRNP Proteins.  
641 *Exp Cell Res.* 1995;221: 187–196. doi:10.1006/excr.1995.1366
- 642 23. Ertel KJ, Brunner JE, Semler BL. Mechanistic Consequences of hnRNP C Binding to Both  
643 RNA Termini of Poliovirus Negative-Strand RNA Intermediates. *J Virol.* 2010;84: 4229–  
644 4242. doi:10.1128/JVI.02198-09
- 645 24. Brunner JE, Nguyen JHC, Roehl HH, Ho TV, Swiderek KM, Semler BL. Functional  
646 interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C with poliovirus RNA synthesis  
647 initiation complexes. *J Virol.* 2005;79: 3254–3266. doi:10.1128/JVI.79.6.3254-3266.2005

- 648 25. Brunner JE, Ertel KJ, Rozovics JM, Semler BL. Delayed kinetics of poliovirus RNA  
649 synthesis in a human cell line with reduced levels of hnRNP C proteins. *Virology*.  
650 2010;400: 240–247. doi:10.1016/j.virol.2010.01.031
- 651 26. Kim K-S, Chapman NM, Tracy S. Replication of Coxsackievirus B3 in Primary Cell  
652 Cultures Generates Novel Viral Genome Deletions. *J Virol*. 2008;82: 2033–2037.  
653 doi:10.1128/JVI.01774-07
- 654 27. Meertens L, Hafirassou ML, Couderc T, Bonnet-Madin L, Kril V, Kümmerer BM, et al.  
655 FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. *Nature*. 2019;574: 259–263.  
656 doi:10.1038/s41586-019-1578-4
- 657 28. Li G, Zhang J, Tong X, Liu W, Ye X. Heat Shock Protein 70 Inhibits the Activity of  
658 Influenza A Virus Ribonucleoprotein and Blocks the Replication of Virus In Vitro and In  
659 Vivo. Meurs E, editor. *PLoS ONE*. 2011;6: e16546. doi:10.1371/journal.pone.0016546
- 660 29. Ramirez-Carvajal L, Long CR. Down-regulation of viral replication by lentiviral-  
661 mediated expression of short-hairpin RNAs against vesicular stomatitis virus ribonuclear  
662 complex genes. *Antiviral Res*. 2012;95: 150–158. doi:10.1016/j.antiviral.2012.05.007
- 663 30. Sesti-Costa R, Françaço MCS, Silva GK, Proenca-Modena JL, Silva JS. TLR3 is required  
664 for survival following Coxsackievirus B3 infection by driving T lymphocyte activation  
665 and polarization: The role of dendritic cells. *PloS One*. 2017;12: e0185819.  
666 doi:10.1371/journal.pone.0185819
- 667 31. Gorbea C, Makar KA, Pauschinger M, Pratt G, Bersola JLF, Varela J, et al. A role for  
668 Toll-like receptor 3 variants in host susceptibility to enteroviral myocarditis and dilated  
669 cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 2010;285: 23208–23223. doi:10.1074/jbc.M109.047464
- 670 32. Ng CT, Oldstone MBA. IL-10: achieving balance during persistent viral infection. *Curr*  
671 *Top Microbiol Immunol*. 2014;380: 129–144. doi:10.1007/978-3-662-43492-5\_6
- 672 33. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1  
673 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29: 313–326.  
674 doi:10.1089/jir.2008.0027
- 675 34. Wang JP, Cerny A, Asher DR, Kurt-Jones EA, Bronson RT, Finberg RW. MDA5 and  
676 MAVS Mediate Type I Interferon Responses to Coxsackie B Virus. *J Virol*. 2010;84: 254–  
677 260. doi:10.1128/JVI.00631-09
- 678 35. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and  
679 Type III Interferons. *Immunity*. 2019;50: 907–923. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.025
- 680 36. Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse Interference: How Viruses Fight the Interferon  
681 System. *Viral Immunol*. 2004;17: 498–515. doi:10.1089/vim.2004.17.498
- 682 37. Hyde JL, Chen R, Trobaugh DW, Diamond MS, Weaver SC, Klimstra WB, et al. The 5'  
683 and 3' ends of alphavirus RNAs – Non-coding is not non-functional. *Virus Res*. 2015;206:  
684 99–107. doi:10.1016/j.virusres.2015.01.016

- 685 38. Chigbu DI, Loonawat R, Sehgal M, Patel D, Jain P. Hepatitis C Virus Infection: Host–  
686 Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells*. 2019;8.  
687 doi:10.3390/cells8040376
- 688 39. Mura M, Combredet C, Najburg V, Sanchez David RY, Tangy F, Komarova AV.  
689 Nonencapsidated 5' Copy-Back Defective Interfering Genomes Produced by  
690 Recombinant Measles Viruses Are Recognized by RIG-I and LGP2 but Not MDA5.  
691 García-Sastre A, editor. *J Virol*. 2017;91: e00643-17, /jvi/91/20/e00643-17.atom.  
692 doi:10.1128/JVI.00643-17
- 693 40. Tu Z, Chapman NM, Hufnagel G, Tracy S, Romero JR, Barry WH, et al. The  
694 cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the  
695 genomic 5' nontranslated region. *J Virol*. 1995;69: 4607–4618.
- 696 41. Basso C, Aguilera B, Banner J, Cohle S, d'Amati G, de Gouveia RH, et al. Guidelines for  
697 autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for  
698 European Cardiovascular Pathology. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2017;471: 691–705.  
699 doi:10.1007/s00428-017-2221-0
- 700 42. N'Guyen Y, Lesaffre F, Metz D, Tassan S, Saade Y, Boulagnon C, et al. Enterovirus but  
701 not Parvovirus B19 is associated with idiopathic dilated cardiomyopathy and  
702 endomyocardial CD3, CD68, or HLA-DR expression. *J Med Virol*. 2017;89: 55–63.  
703 doi:10.1002/jmv.24600
- 704 43. Wang P-H, Schulenberg G, Whitlock S, Worden A, Zhou N, Novak S, et al. RNase If -  
705 treated quantitative PCR for dsRNA quantitation of RNAi trait in genetically modified  
706 crops. *BMC Biotechnol*. 2018;18. doi:10.1186/s12896-018-0413-6
- 707
- 708

709 **Figures**



710

711 **Fig 1. Histopathological lesions in main organs of CVB3/28-infected DBA2/J mice.** A. In  
 712 the infected group, cardiac lesions were found at 3 DPI, until 28 DPI. Infected mice exhibited  
 713 sparse inflammatory foci at 3 DPI, and multiple inflammatory foci at 7 DPI. At 14 and 28 DPI,  
 714 calcified fibrosis was found. At 3 DPI, diffuse pancreatic inflammatory infiltrates with necrosis  
 715 were found, sparing islets cells. After 14 DPI, an adipose tissue replacement was found, sparing  
 716 islets cells. Hepatitis was found at 3 and 7 DPI, characterized by sparse inflammatory and  
 717 necrosis foci or sub capsular inflammatory infiltrates. After 14 DPI, no inflammatory or  
 718 scarring lesions were found. HES, haematoxylin-eosin-safran staining. Original magnification:  
 719 UI, 20x; 3 and 7 DPI, 200x; 14 and 28 DPI, 400x. B. Inflammation and necrosis were found in  
 720 the heart and pancreas at 3 (n=3 to 5) and 7 DPI (n=3 to 5), with a decrease until 28 DPI (n=3  
 721 to 4). Fibrosis was present only in the heart at 14 (n=2) and 28 DPI (n=4). Inflammation and  
 722 necrosis were present in the liver at 3 (n=3) and 7 DPI (n=3) only, with no chronic histological  
 723 lesion. Data represent mean +/- range. C. Positive CD3 and CD68 cells were found in  
 724 inflammatory foci or infiltrates at 7 DPI in cardiac, pancreatic and hepatic tissues. They were  
 725 absent in uninfected mice. Original magnification: Heart, 200x; pancreas and liver, 400x. DPI:  
 726 Days Post-Infection. UI: Uninfected.

727

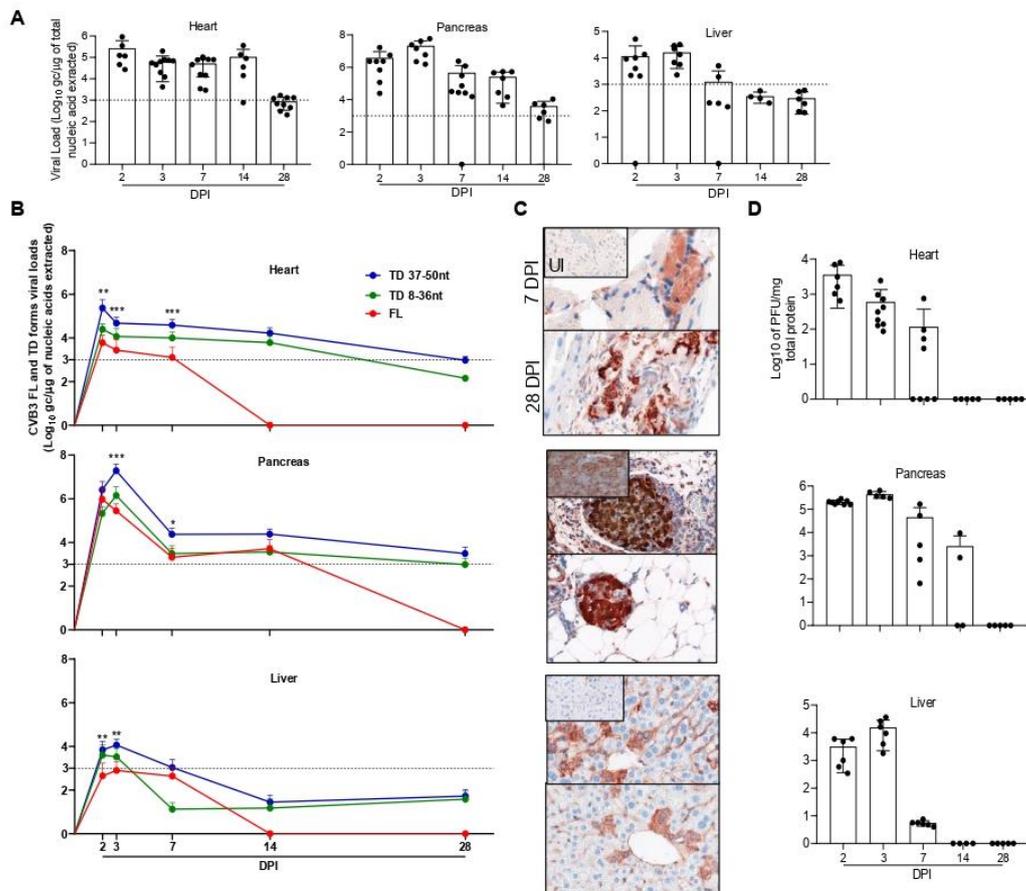
728

729

730

731

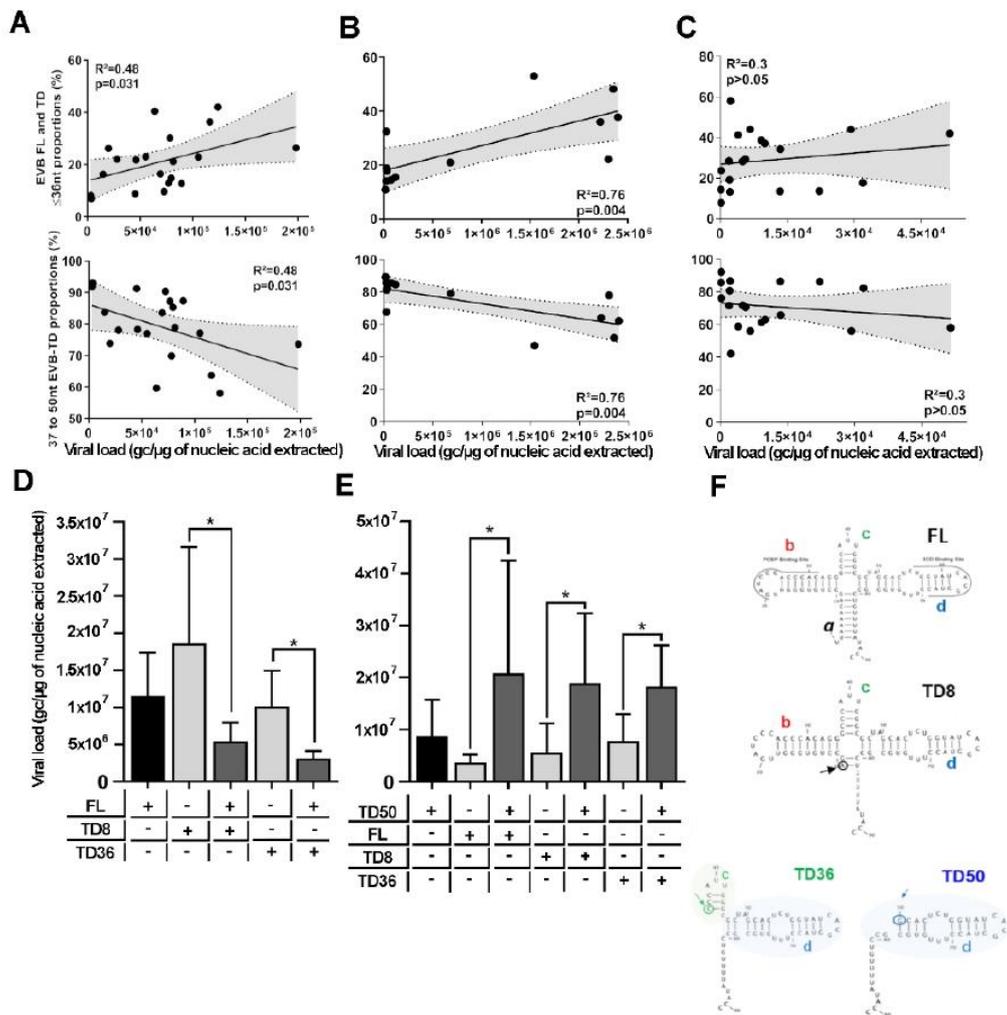
732



733

734 **Fig 2. Quantitative detection and viral properties of CVB3/28 FL and 5'TD RNA**  
 735 **populations in the heart, pancreas and liver tissues.** A. Viral load levels were assessed in the  
 736 heart, pancreas and liver of CVB3/28 infected DBA2/J mice at 2 (n= 6 to 8), 3 (n= 6 to 10), 7  
 737 (n= 6 to 10), 14 (n= 6 to 7) and 28 DPI (n= 6 to 9) by classic RT-qPCR assay. Dotted line  
 738 represents the significance threshold of  $10^3$  genome copies (gc)/nucleic acid extracted. Data  
 739 represent mean +/- SD. B. EV-B FL and 5'TD respective viral loads were assessed using a  
 740 RACE-PCR method associated with a micro-electrophoresis (Agilent®), in the heart, pancreas  
 741 and liver tissues of infected DBA2/J mice, at 2 (n= 6 to 8), 3 (n= 6 to 10), 7 (n= 6 to 10), 14 (n=  
 742 6 to 7) and 28 DPI (n= 6). Dotted line represents the significance threshold of  $10^3$  gc/nucleic  
 743 acid extracted. Data represent mean +/- SD (Mann-Whitney U test; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*:  
 744 p<0.001; \*\*\*\*: p<0.0001). C. VP1 was detected at 7 DPI in cardiac cells surrounding  
 745 inflammatory foci. At 28 DPI, cardiac cells exhibited sparse positivity for VP1, mostly  
 746 surrounding calcified fibrosis. VP1 was present in Langerhans islets of the pancreas at 7 and 28  
 747 DPI. VP1 was found around inflammatory foci in hepatocytes at 7 DPI. At 28 DPI, sparsely  
 748 VP1 positivity was detected in hepatocytes. Original magnification: 400x. D. Viral titers were  
 749 measured in the homogenized heart, pancreas and liver supernatants of CVB3/28 infected  
 750 DBA2/J mice at 2 (n= 6 to 8), 3 (n= 5 to 9), 7 (n= 5 to 7), 14 (n= 4 to 6) and 28 DPI (n= 5) after  
 751 infection by classic plaque forming unit assay. Data represent mean +/- SD. DPI: Days Post-  
 752 Infection. UI: Uninfected. TD: Terminally Deleted. FL: Full-length.

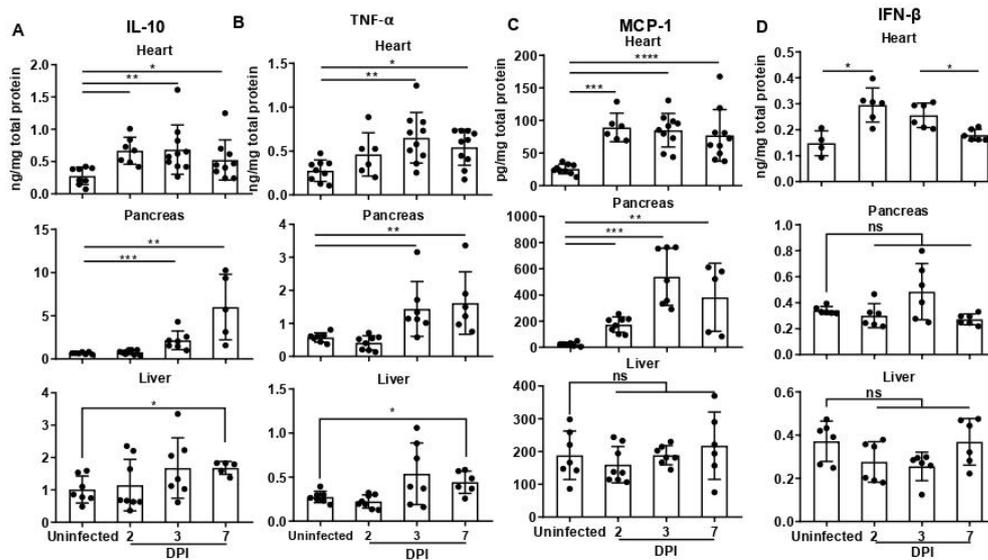
33



753

754 **Fig 3. Impact of EV-B Full-Length or 5' terminally deleted viral populations' proportions**  
 755 **on replication activities.** A. B. In the heart (n=20) and pancreas (n=13) tissues of infected  
 756 DBA2/J mice, we found a positive correlation between viral loads and the proportions of FL  
 757 and 8-36nt 5'TD viral populations, during acute phase of infection (D2-D7). In contrast, a  
 758 negative correlation was found between viral loads and the proportions of 37 to 50nt 5'TD  
 759 viral population. C. No correlation was found between viral loads and proportions of FL or 5'TD  
 760 viral population in the liver (n=19). Data represent linear regression curves and Spearman R  
 761 coefficient. D. E. Viral load levels were assessed by classic RT-qPCR assay, after 24 hours of  
 762 incubation following the transfection of HCM with EV-B 5'TD and FL RNA mixtures  
 763 mimicking proportions (respectively for FL, TD8, TD36 and TD50: 20%, 20%, 20% and 75%)  
 764 found in organs with lesions (n=6). Data represent mean +/- SD (Mann-Whitney U test; \*:  
 765  $p<0.05$ ). F. Schematic representation of EV-B Cloverleaf secondary structures with stem "a"  
 766 and stem-loops "b", "c" and "d". Schematic representations of deletions of 8, 36 and 50  
 767 nucleotides and its impact on cloverleaf secondary structures, loss of stem "a", stem "a" plus  
 768 stem-loop "b" and loss of stem "a" and stem-loops "b-c", respectively.

34



769

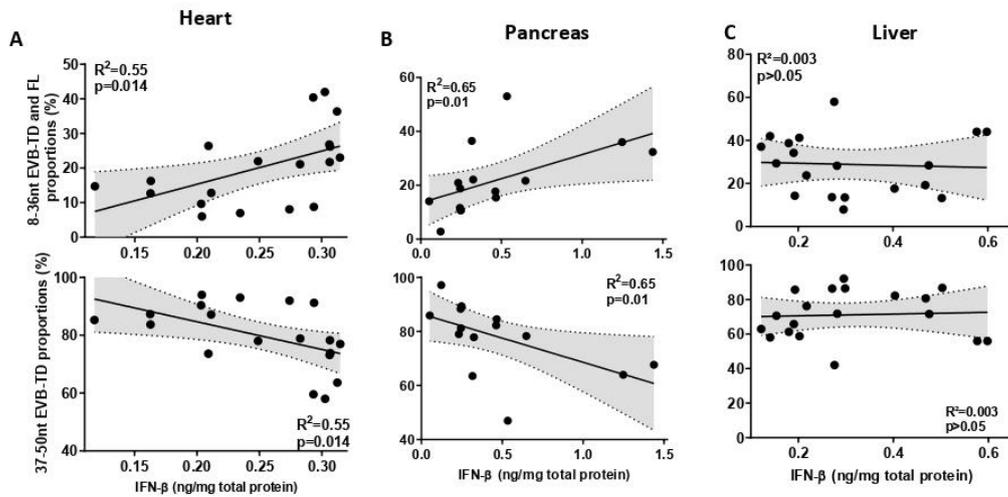
770 **Fig 4. Th1 cytokine response levels in target tissues with lesions of CVB3/28-infected**  
 771 **DBA2/J mice.** A.B.C.D. IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and IFN- $\beta$  levels were measured by ELISA in  
 772 homogenized heart, pancreas and liver tissues supernatants of DBA2/J mice at acute phase of  
 773 CVB3/28 infection (D2, n= 6 to 8; D3, n= 6 to 10; D7 n= 6 to 10) and compared to cytokines  
 774 levels in homogenized organs supernatants of uninfected DBA2/J mice (n= 5 to 10). Data  
 775 represent mean +/- SD (Mann-Whitney U test; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001; \*\*\*\*:  
 776 p<0.0001). DPI: Days Post-Infection. Ns or not specified: non-significant.

777

778

779

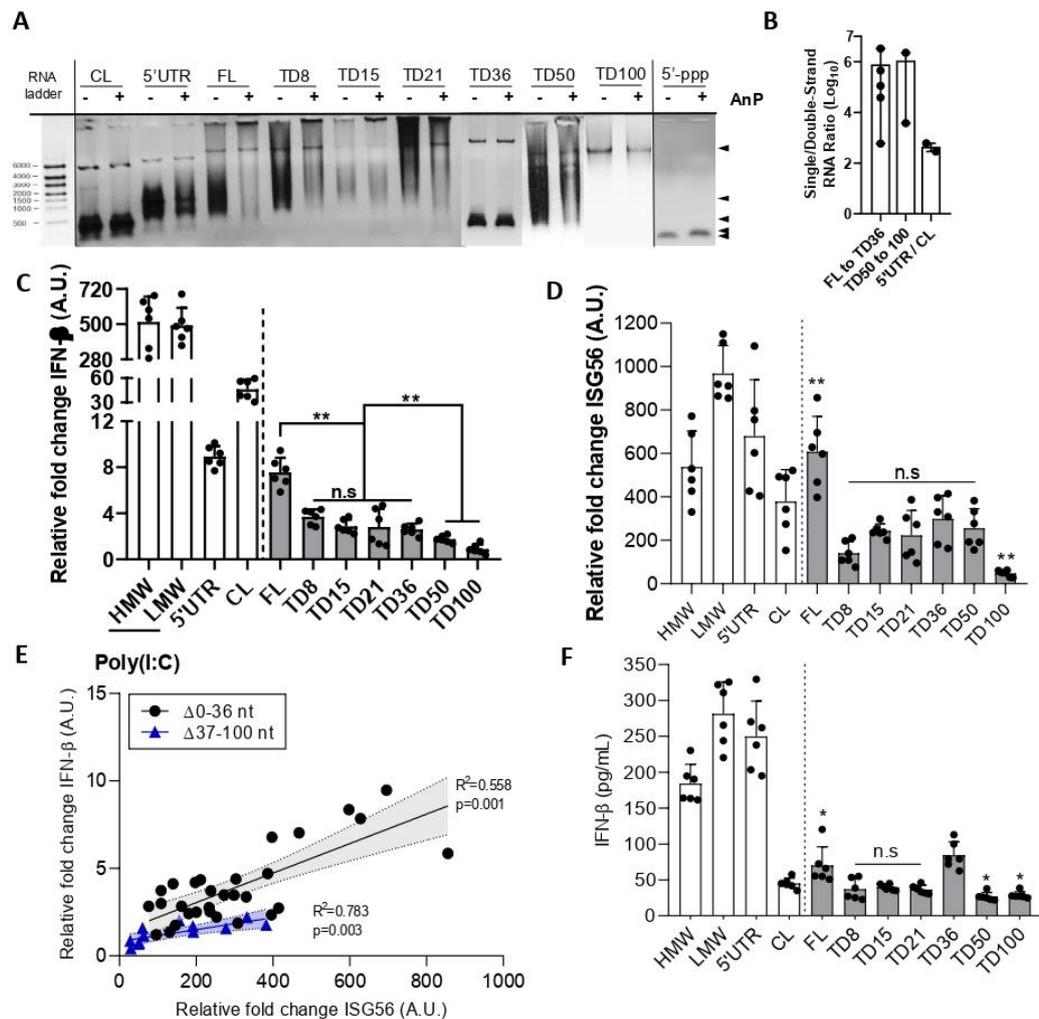
780



781

782 **Fig 5. Correlation between IFN- $\beta$  levels and proportions of full-length or 5' terminally**  
 783 **deleted viral populations.** A.B. In the heart (n=19) and pancreas (n=15) tissues of infected  
 784 DBA2/J mice, we found a positive correlation between IFN- $\beta$  levels and the proportions of FL  
 785 and less than 36nt 5' TD viral populations, during acute phase of infection (D2-D7). In contrast,  
 786 a negative correlation was found between IFN- $\beta$  levels and the proportions of 37 to 50nt 5' TD  
 787 viral population. C. No correlation was found between IFN- $\beta$  levels and proportions of FL or  
 788 5' TD viral population in the liver tissues (n=19). Data represent linear regression curves and  
 789 Spearman R coefficient.

790



791

792 **Fig 6. IFN- $\beta$  mRNA and cytokine secretion by human primary cardiomyocytes**  
 793 **transfected with full-length or CVB3/28 5'terminally deleted RNA forms.** A. Synthetic  
 794 CVB3/28 RNA 5'TD and FL were untreated or treated by Antarctic Phosphatase (AnP). Result  
 795 of synthetic RNA forms treatment by AnP was visualized using 1% agarose gel electrophoresis.  
 796 Arrows indicated the RNA band sizes on the gel picture. B. Quantification (RT-qPCR) of  
 797 double-strand and single-strand viral RNA copy number after RNase A digestion of CVB3/28  
 798 synthetic RNA. The  $\log_{10}$  single-strand to double-strand viral RNA ratio was calculated as  
 799 followed: total EV RNA – double-strand EV RNA/double-strand EV RNA. Data present mean  
 800 +/- range. C and D. IFN- $\beta$  and ISG56 semi-quantitative RT-qPCR results were expressed as  
 801 fold change over mock transfected cells after normalization to housekeeping mRNA expression.  
 802 Data represent mean +/- SD (n=3) (Mann-Whitney U test; \*\*: p<0.01 and n.s: non-significant).  
 803 E. Linear regression curve between relative fold change of IFN- $\beta$  and ISG56 after EV-B 5'TD  
 804 and FL RNA transfection (0-36nt: n=28; 37-100nt: n=12) in cultured cardiomyocytes. Data  
 805 represent linear regression curves and Spearman R coefficient. F. IFN- $\beta$  levels were quantified  
 806 by ELISA in supernatants of cardiomyocytes cells at 8 hours' post-transfection of various EV-

37

807 B RNA forms. Data represent mean +/- SD (n=3) (Mann-Whitney U test; \* p<0.05 and n.s:  
808 non-significant). CVB3/28 RNA, full-length form (FL) and deleted CVB3/28 forms of 8, 15,  
809 21, 36, 50, 100 nucleotides (TD8, TD15, TD21, TD36, TD50 and TD100); Positive controls:  
810 CL: Cloverleaf; 5'UTR: 5'untranslated transcribed region; LMW: low molecular weight;  
811 HMW: high molecular weight).

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

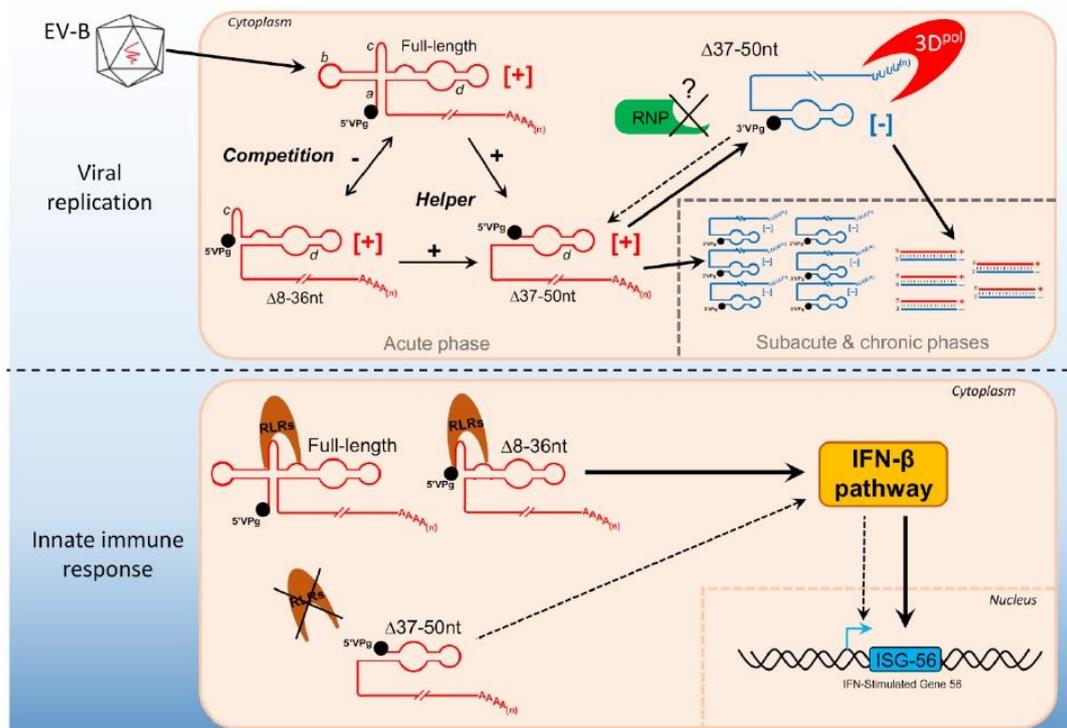
822

823

824

825

826

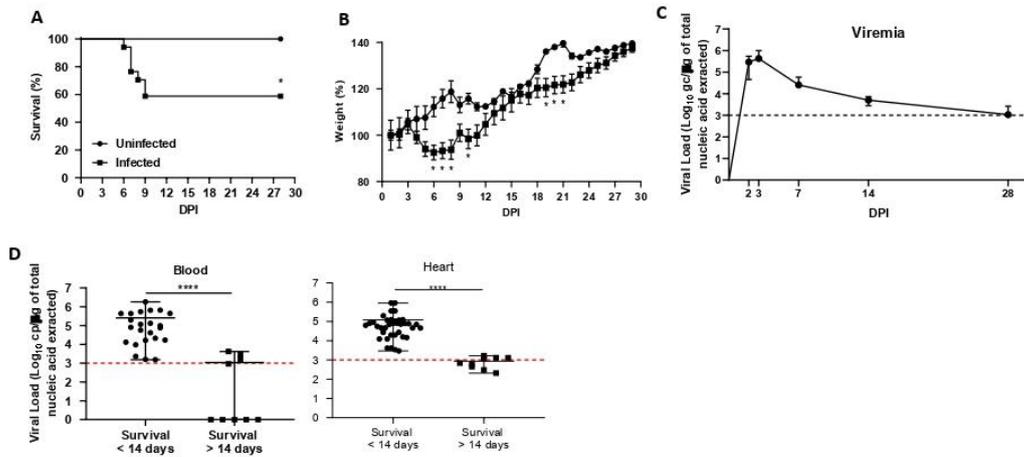


827

828 **Fig 7. Graphical abstract of acute EV-B infection with rapid emergence of 5'TD viral**  
 829 **forms leading to persistent infection.** The early emergence of major proportions of EV-B  
 830 5'TD populations regulates viral genomic replication activities (at the top) and levels of type 1  
 831 IFN (at the bottom) at acute phase of target cell infection, a potential way to overcome antiviral  
 832 immune innate host response (IFN- $\beta$  and ISG expression levels down regulation) and to lead to  
 833 persistent infection of the heart and pancreas (negative and double-strands vRNA  
 834 accumulation).

835

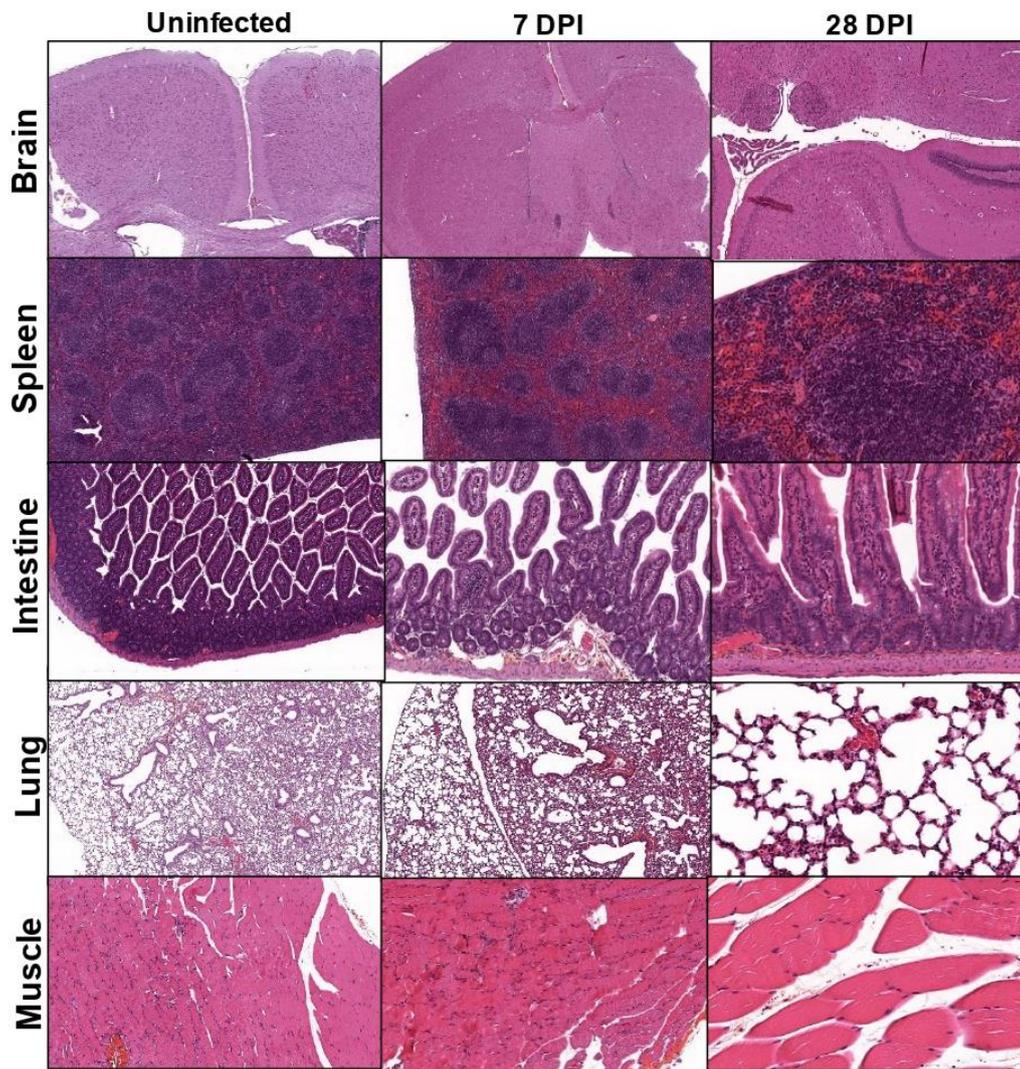
836 **Supporting information**



837

838 **S1 Fig. Morbi-mortality and viremia in CVB3-infected DBA2/J mice.** A. Survival curve of  
 839 infected DBA2/J mice (n=17; black circle) with  $10^6$  PFU/ml of CBV3/28 compared to  
 840 uninfected mice (n=8; black square). Mock-infected mice had a 100% survival at 28 DPI,  
 841 whereas infected mice had 41% survival (7/17) (\*:  $p < 0.05$  by Log-Rank test). B. Follow-up of  
 842 body weight of surviving CVB3/28-infected mice (n=3; black circle) and uninfected DBA2/J  
 843 mice (n=3; black square) from 0 to 28 DPI. Data represent mean  $\pm$  SEM (\*:  $p < 0.05$  by  
 844 Multiple t tests). C. Kinetic of viremia following infection with  $10^6$  PFU/ml of CBV3/28 in  
 845 DBA2/J mice, from 2 to 28 DPI (n=35). Dotted line represent the significance threshold. Data  
 846 represent mean  $\pm$  SD. D. Comparison of viremia between high morbi-mortality of CVB3/28  
 847 infection in DBA2/J mice, to assess a viral load significance threshold of  $10^3$  gc/nucleic acid  
 848 extracted in blood (n=23: 2-7 DPI; n=9: 28 DPI) and in heart (n=37: 2-7 DPI; n=9: 28 DPI),  
 849 pancreas (n=24: 2-7 DPI; n=6: 28 DPI) and liver tissues (n=21: 2-7 DPI; n=6: 28 DPI). Data  
 850 represent mean  $\pm$  range (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$  by Mann-Whitney U test)

851



852

853 **S2 Fig. No histopathological lesion in other target organs.** In the brain, the spleen, the  
 854 intestines, the lungs and the muscle of CVB3/28-infected DBA2/J mice, no chronic nor acute  
 855 histological lesions were found, at 3, 7, 14 or 28 DPI, compared to organs of mock-infected  
 856 mice. HES, haematoxylin-eosin-safran staining. Original magnification: x40, all uninfected;  
 857 x20, x40, x40, x100, x40, from top to bottom 7 DPI; x40, x200 from top to bottom, 28 DPI.

858

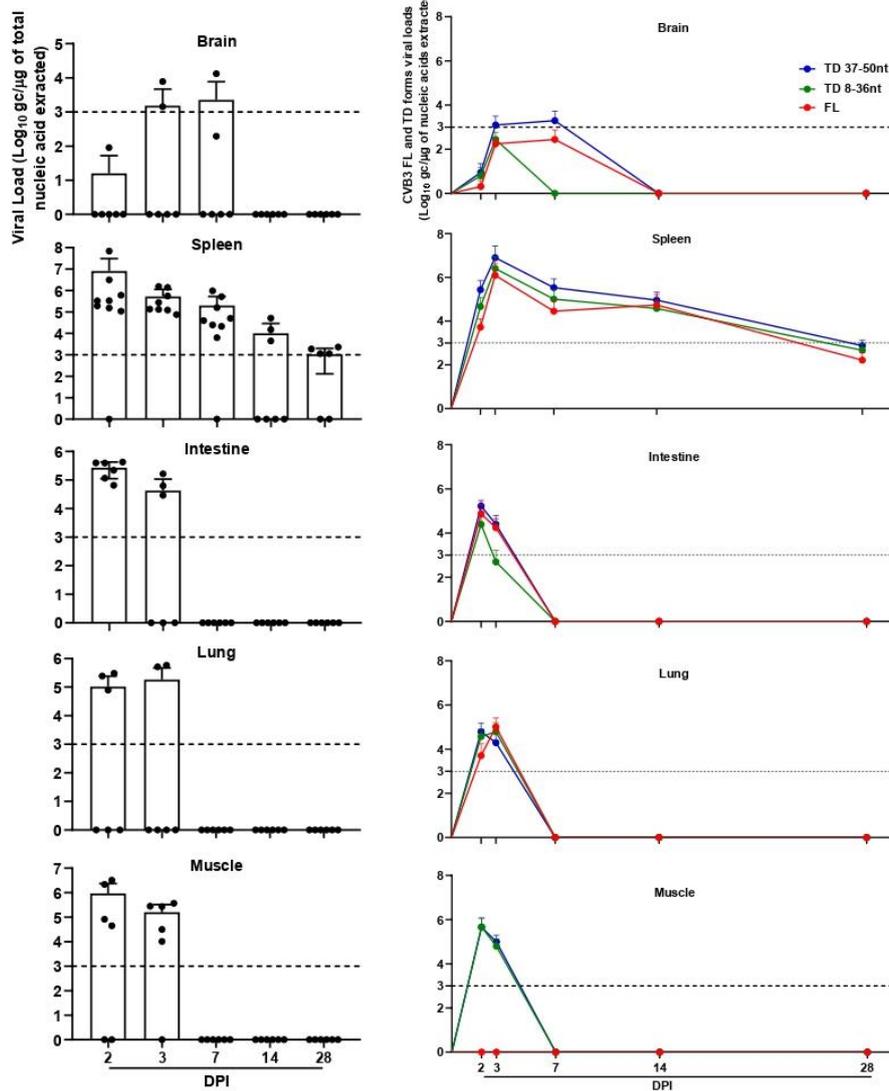
859

860

861

862

863



864

865 **S3 Fig. EV-B total and subpopulations (full-length and 5' terminally deleted) genome copy**  
 866 **number in target organs without lesions.** Brain, intestines, lungs and muscle: n=6; Spleen:  
 867 n=6 to 9. Data represent mean +/- SD. DPI: Days post-infection.

868

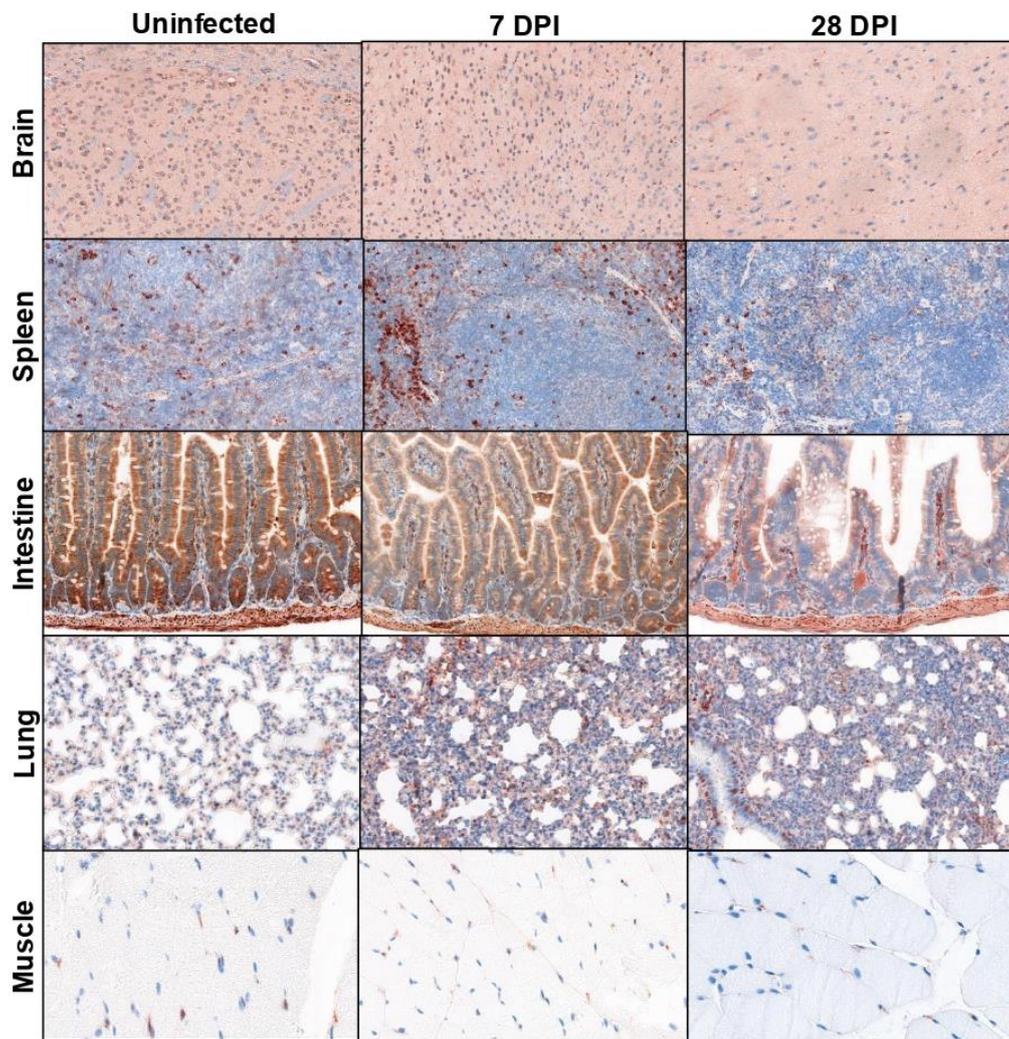
869

870

871

872

873



874

875 **S4 Fig. Absence of Viral Protein 1 in target organs without lesions.** Viral protein 1 was not  
 876 detected using immunohistochemistry on FFPE samples of the brain, spleen, intestines, lungs  
 877 and muscle of CVB3/28-infected DBA2/J mice (7 and 28 DPI) compared to uninfected mice.  
 878 DPI: Days post-infection.

879

880

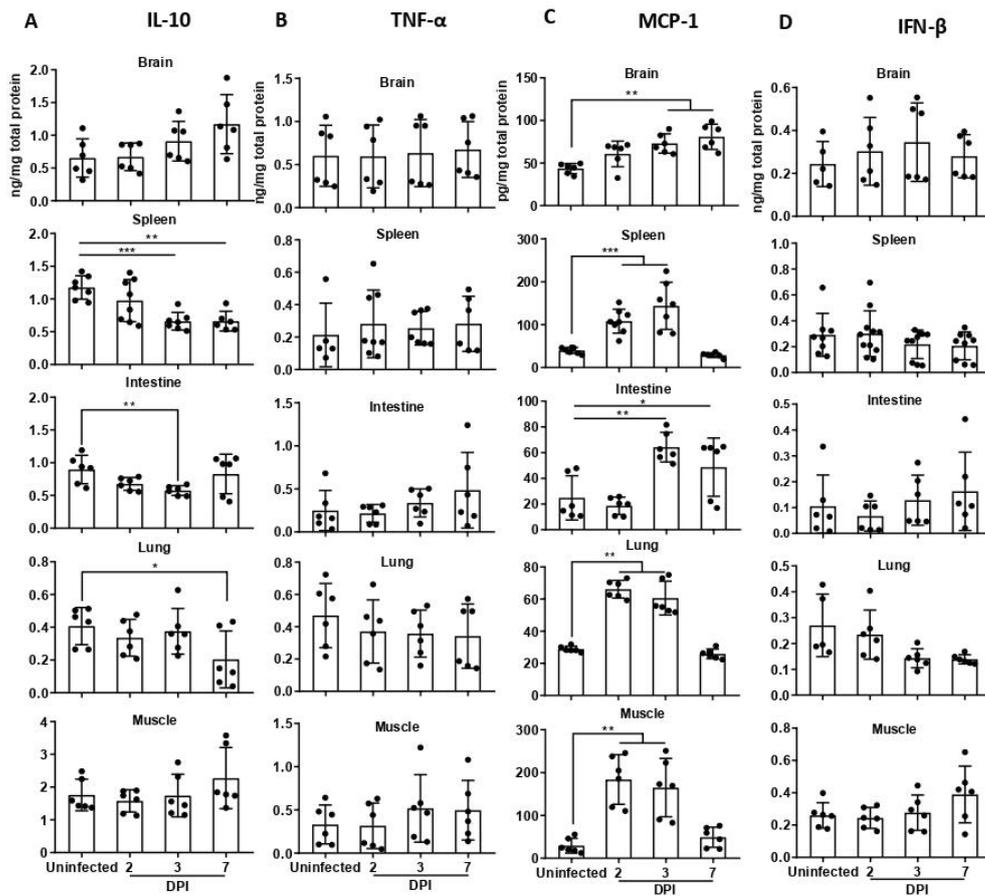
881

882

883

884

885



886

887 **S5 Fig. Th1 cytokine response levels in target organs without lesions.** A.B.C.D. IL-10, TNF-  
 888  $\alpha$ , MCP-1 and IFN- $\beta$  levels were measured by ELISA in homogenized brain, spleen, intestines,  
 889 lungs and muscle supernatants of DBA2/J mice at acute phase of CVB3/28 infection (2 DPI,  
 890 n= 6; 3 DPI, n= 6; 7 DPI n= 6) and compared to cytokines levels in homogenized organs  
 891 supernatants of uninfected DBA2/J mice (n= 6). Data represent mean +/- SD (Mann-Whitney  
 892 U test; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001; \*\*\*\*: p<0.0001). DPI: Days post-infection. Not  
 893 specified: non-significant.

894

895

896

897

898

899

900 **S1 Table. EV-B viral loads, titers and full-length and 5'terminally deleted populations**  
901 **proportions in target organs without lesions.** A. Viral loads in genome copies (gc) per µg of  
902 total acid nucleic extracted. B. Viral titers in PFU per mg of total protein. C.D.E. EV-B Full-  
903 length and 5'terminally deleted viral populations proportions (%). ND: Non-detectable; NA:  
904 Non-Available. DPI: Days post infection.

905 **S2 Table. Th1 cytokine response levels in target organs without lesions.** A. IL-10 levels in  
906 ng/mg of total protein. B. MCP-1 levels in pg/mg of total protein. C. TNF-α levels in ng/mg of  
907 total protein. D. IFN-β levels in ng/mg of total protein. ND: Non-detectable; NA: Non-  
908 Available. DPI: Days post infection.

909 **S3 Table. Viral properties of EV-B RNA forms in target organs with lesions at 3, 14 and**  
910 **28 DPI.** A. Positive, negative, single and double strands viral RNA copy number (gc/µg of  
911 nucleic acids extracted). B. Viral loads (gc/µg of nucleic acids extracted) and titers (PFU/ml)  
912 in HeLa 229 cells infected with Proteinase K non-treated and treated homogenized tissues  
913 supernatants of the heart, pancreas and liver of CVB3/28-infected DBA2/J mice, at 3, 14 and  
914 28 DPI. ND: Non-detectable; NA: Non-Available.

915 **S4 Table. Transfection of synthetic various CVB3-RNAs in human primary**  
916 **cardiomyocytes.** A. Viral load levels by classic RT-qPCR assay (gc/µg of nucleic acids  
917 extracted), after 24 hours of incubation following the transfection of HCM with EV-B 5'TD  
918 and FL RNA mixtures. B. Single and double strands viral RNA copy number (gc/µg of nucleic  
919 acids extracted) of synthetic various CVB3-RNAs. IFN-β and ISG56 semi-quantitative RT-  
920 qPCR results expressed as fold change (A.U.) over mock transfected cells after normalization  
921 to housekeeping mRNA expression at 8 hours' post-transfection. IFN-β levels by ELISA in  
922 supernatants of cardiomyocytes cells at 8 hours' post-transfection of various EV-B RNA forms  
923 (pg/mL).

## VII. Article n° 3: La reconnaissance des ARN génomiques d'EV-B majoritairement tronquées en région 5'NC dépendante de RIG-I inhibe la réponse interféron de type I.

---

Dans des modèles de culture de cellules murines et humaines, Feng et al., (2014) ont démontré que le domaine I (structure dite en « feuille de trèfle »; *Cloverleaf*) de l'ARN génomique d'Entérovirus du groupe B (EV-B) contenant une structure triphosphate (5'ppp) à l'extrémité 5' était essentiel pour induire une réponse interféron (IFN) de type I significative et activer les gènes stimulés par l'interféron (ISG, *Interferon Stimulated Gene*) via la voie de signalisation dépendante de RIG-I<sup>15</sup>. Il a été démontré que les formes d'EV-B tronquées en région 5' non-codante (5'NC) affectent les éléments fonctionnels de la structure dite en « feuille de trèfle » (CL, *Cloverleaf*) du domaine I de l'ARN<sup>308-310</sup>. La perte de certaines structures secondaires du domaine I de l'ARN pourrait modifier la reconnaissance de l'ARN génomique viral par les senseurs cytoplasmiques de l'immunité que sont les *RIG-I-like receptors* (RLRs) (RIG-I ou MDA5) pendant la phase précoce de la réponse immunitaire innée antivirale. La reconnaissance des différentes formes d'EV-B tronquées en région 5'NC via les voies de signalisation dépendantes de RIG-I ou MDA5 pourrait moduler l'activation de la voie de production des IFN de type I. Cette régulation des niveaux de transcription et de traduction de l'IFN- $\beta$  et des ISG56 dans les cellules infectées serait un moyen d'échapper à la réponse immunitaire innée antivirale de l'hôte.

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'impact des proportions des populations d'EV-B complètes ou tronquées en région 5'NC sur les niveaux de production d'IFN de type I dans le sang périphérique des patients atteints d'infections aiguës à EV-B. Suite à cette première phase d'identification des profils des populations virales dans le sang circulant, des ARNs synthétiques de CVB3/28 avec des séquences complètes ou tronquées en région 5'NC ont été générés *in vitro* et ont été transfectés dans des cellules cardiaques primaires humaines (HCM, *Human cardiomyocytes*) dans des proportions similaires à celles observées dans les prélèvements de patients souffrant d'infections aiguës à EV-B. Ce modèle expérimental nous a permis d'étudier les caractéristiques moléculaires des mélanges

des formes d'ARN génomiques complètes et tronquées en région 5'NC mais aussi d'identifier les structures du domaine I de l'ARN responsables de l'induction des IFN- $\beta$  et de l'activation des gènes antiviraux tels que les ISG56. En utilisant des lignées cellulaires STING37 modifiées par inactivation de l'expression de chacun des RLRs (Knock down pour LGP2, MDA5 ou RIG-I), nous avons précisé au niveau moléculaire quels étaient le ou les senseurs cytoplasmiques de l'immunité innée (RIG-I et/ou MDA5) majoritairement responsables de la détection des différentes formes d'EV-B complètes ou tronquées en région 5'NC de l'ARN génomique viral.

En définitive, nous avons identifié la présence de populations majoritaires d'EV-B tronquées (délétions de 36 à 50 nt) associées à des formes ARN minoritaires tronquées de 8 à 36 nt et complètes dans des prélèvements de sang périphérique de patients atteints d'infections aiguës à EV-B. Nos résultats ont mis en évidence deux sous-groupes de patients présentant des niveaux médians d'ARNm IFN- $\beta$  dans le sang statistiquement différent avec deux profils distincts de proportions de formes EV-B complètes et tronquées en région 5'NC suggérant que les différentes formes virales pourraient moduler les mécanismes de reconnaissance des ARN génomiques viraux par les senseurs cytoplasmiques de l'immunité lors d'une infection EV-B aiguë dans les cellules cibles. Notre modèle expérimental de transfection d'ARN viraux synthétiques complets ou tronqués en 5'NC dans des HCM nous a permis d'identifier la structure en tige-boucle « d », et plus particulièrement les nucléotides en position 46 à 50nt du domaine I de la région 5'NC de l'ARN génomique comme étant indispensable pour l'activation de la réponse immunitaire innée antivirale. Nos résultats mettent en évidence pour la première fois une reconnaissance des formes majoritaires d'ARN d'EV-B tronquées en région 5'NC dépendante de RIG-I avec un rétrocontrôle négatif exercé par LGP2 aboutissant à une diminution de l'activation des voies de production des interférons de type I dans les cellules cibles humaines.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que les délétions naturellement observées dans la région 5'NC des EV-B au cours d'infection aiguës chez l'homme permettraient au virus de moduler les niveaux de reconnaissance de ses ARN génomiques par les récepteurs cytoplasmiques de type « RLRs ». Ces données ouvrent de nouvelles perspectives pour de futures stratégies en immunothérapie visant à rétablir une

réponse immunitaire innée antivirale efficace et potentiellement d'obtenir une clairance virale des cellules cibles.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

**Draft manuscript**

**Full Title (103 characters)**

**RIG-I Dependant Sensing for Major 5'Terminally Deleted Enterovirus  
RNA Forms down Regulates type I Interferon Response**

**Short title (57 characters):**

**RIG-I Dependant Sensing for 5' deleted Enterovirus RNA**

M. Glenet\*<sup>1</sup>, A-L. Lebreil\*<sup>1</sup>, F. Tanguy<sup>2</sup>, Y. N'Guyen<sup>3</sup>, D. Callon<sup>1</sup>, F. Berri<sup>1</sup>, V-G. Ruggieri<sup>4</sup>, S.  
Rubin<sup>4</sup>, V. Najburg<sup>2</sup>, A. Komarova<sup>2</sup>, L. Andreoletti<sup>1,3\*\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Reims Champagne Ardenne, Cardiovir EA-4684, Reims, France

<sup>2</sup> Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, CNRS UMR-3569, Paris, France

<sup>3</sup> CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Virology Department, Reims, France

<sup>4</sup>Service de chirurgie cardio-thoracique, CHU Reims, Reims, France

\*These two authors contributed equally to this work

\*\* Corresponding author:

Laurent Andreoletti, MD, PhD

Laboratoire de Virologie Médicale et Moléculaire

and EA-4684 Cardiovir, Hôpital Robert Debré

Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex, France

Tel: (+33) 3 26 78 77 02

Fax: (+33) 3 26 78 41 34

Email: [landreoletti@chu-reims.fr](mailto:landreoletti@chu-reims.fr)

30 **Abstract: (241 Words)**

31

32 Type I interferon (IFN) signaling is required to activate an innate immune response  
33 against group-B Enterovirus (EV-B) human infections. To date, the impact of various  
34 5' terminally deleted (5'TD) EV-B RNA populations on type I IFN pathway activation in  
35 target cells remains unknown. In peripheral blood of patients with EV-B acute  
36 infections, we identified by RACE-PCR two major 5'TD RNA populations whose  
37 proportions were positively or negatively correlated to IFN- $\beta$  levels. Through  
38 transfection of synthetic full-length or 5' TD CV-B3 RNA forms alone or associated in  
39 proportions mimicking those observed in acute viral populations into human  
40 cardiomyocytes, we demonstrated that stem-loop "d" structure of EV-B RNA domain I  
41 possesses a short sequential nucleotide motif responsible for IFN- $\beta$  pathway induction.  
42 Using STING-37 cell lines "knock-down" for each RLRs (RIG-I or MDA5), we  
43 evidenced that the sensing of 5'TD RNA forms characterized by the loss of this short  
44 RNA motif was RIG-I-dependent and associated with an LGP2 negative feedback,  
45 resulting in IFN- $\beta$  response decrease in human cells. By contrast the innate immune  
46 sensing of FL or 5'TD forms with conserved stem-loop "d" structure was MDA5-  
47 dependent sensing and associated with high levels of IFN- $\beta$  production. Natural  
48 deletions affecting domain I of 5'NC region of EV-B genome modulate the immune  
49 sensing of viral RNA by RLRs. These data should stimulate the development of target  
50 immunotherapies aiming to restore an efficient antiviral innate immune response and  
51 potentially to achieve a viral clearance in EV-B human infections.

52 **Key words:** Group B Enterovirus, 5'non-coding genomic deletions, acute myocarditis,  
53 Type I interferons, RIG-I-like receptors, innate immunity

54 **Introduction:**

55

56 Viruses have to achieve replication cycles in various complex cellular environments  
57 and overcome host immune system responses during the pathophysiological phases  
58 of human infections <sup>1-3</sup>. To adapt to successive environmental challenges, RNA  
59 viruses have developed genetic plasticity resulting in the generation of modified forms  
60 of their genome during replication in host target cells <sup>4</sup>. Defective viral genomes  
61 (DVGs) are derived from the parental genome resulting either from substitutions,  
62 deletions and/or insertions, or from drastic changes in the structure of the viral genome  
63 requiring a full-length helper virus to complete the replication cycle <sup>4</sup>. Recently,  
64 unsuspected major 5' terminally deleted enterovirus RNA forms associated with full-  
65 length minor viral genomes have been characterized in pathological human heart  
66 tissues, suggesting that these DVGs may be key pathophysiological factors in some  
67 picornavirus infections <sup>5</sup>.

68 Group-B enteroviruses (EV-B) belonging to the *Picornaviridae* family are common  
69 small naked viruses responsible for a wide range of human pathologies related to acute  
70 or chronic infections <sup>6-8</sup>. Their genome is a single-stranded positive-sense RNA  
71 genome of approximately 7,400 nucleotides composed in the 5' and 3' ends by  
72 untranslated regions (UTR) containing RNA secondary structures which are crucial for  
73 the initiation of the viral replication and translation activities <sup>9,10</sup>. An efficient viral  
74 genomic replication is dependent on different UTR sequences and more specifically  
75 on 5' cloverleaf (CL) RNA structure (RNA domain I) which interacts with viral and  
76 cellular proteins to form viral replication ribonucleoprotein complexes <sup>11-13</sup>. Natural 5'-  
77 terminally deleted (5'TD) viral genomes resulting in the loss of different structures  
78 ranging from stem "a", to stem-loop "b" or "c" or part of stem-loop "d" in the 5' cloverleaf  
79 RNA structure (domain I) were described *in vitro* and *in vivo* experimental models of

3

80 EV-B infections (**Figure 1**)<sup>14-16</sup>. In addition, EV-B populations with 5' terminal genomic  
81 RNA deletions (5'TD) similar to those described in experimental models were  
82 associated with the development of fulminant myocarditis or dilated cardiomyopathy  
83 human cases<sup>5,17,18</sup>. These 5'TD EV-B populations were characterized as low  
84 replicating RNA forms with viral-encoded proteinase activities related with dystrophin  
85 cleavage in human cardiac tissues<sup>5</sup>.

86 Type I interferon (IFN) signaling is required to activate an innate immune response  
87 against group-B Enterovirus (EV-B) human infections<sup>19</sup>. To date, the impact of  
88 different 5'TD EV-B RNA populations on type I IFN pathway activation in target cells  
89 remains unknown. In experimental models, the replication of the 5'TD EV-B RNA forms  
90 was characterized by low RNA-plus /RNA-minus strand ratios resulting in the  
91 production negative-stranded RNA particles. Genomic replication activities of 5'TD  
92 viral populations were enough to result in viral RNA forms recognition by cytosolic  
93 immune sensors and activation of the type I interferon (IFN) pathway in infected cells  
94<sup>20,21</sup>. Retinoic acid- inducible gene I [RIG-I]- like receptors (RLRs) are critical cellular  
95 sensors for immune defense against a wide range of RNA viruses including  
96 Picornaviruses that are recognized through both RIG-I and MDA5, yet the specific  
97 contributions of each receptor to the innate immune response are unclear in various  
98 infected cells<sup>22</sup>. It is experimentally assumed that EV-B full-length (FL) dsRNA forms  
99 are recognized by cellular sensors, including RLRs, more specifically melanoma  
100 differentiation-associated gene 5 (MDA5), leading to transcriptional induction of the  
101 genes encoding type I IFN and other immune genes as interferon stimulated genes  
102 (ISG)<sup>21,23-30</sup>. In human and murine cultured cells, it was evidenced that EV-B RNA  
103 domain I containing a 5' triphosphate structure was essential to induce a significant  
104 type I IFN response and activation of ISG56 genes in a RIG-I dependant signalling

105 pathway<sup>21</sup>. Reported natural deletions within the 5'UTR of EV-B forms are known to  
106 affect functional secondary-structural elements of the RNA domain I (cloverleaf)<sup>14–16</sup>.  
107 The loss of some secondary structures of RNA domain I could impair the viral genomic  
108 RNA recognition by RLRs (RIG-I or MDA5) immune sensors during the early phase of  
109 antiviral innate immune response. RIG-I or MDA5-dependant sensing for different 5'TD  
110 viral RNA forms could modulate in a LGP2-manner type I IFN pathway activation, thus  
111 regulating IFN- $\beta$  and ISG transcription and translation levels in infected cells, a  
112 potential way to overcome antiviral immune innate host response<sup>31–33</sup>.

113

114 In the present study, we first sought to identify the impact of 5'TD EV-B populations  
115 proportions on type I IFN production levels in the peripheral blood of patients with acute  
116 EV-B infections. Subsequently, synthetic CV-B3 RNAs harboring 5' terminal deletions  
117 were generated *in vitro* and transfected in similar proportions to those observed in  
118 acute viral populations into cultured human primary cardiomyocytes (HCM). This  
119 experimental model allowed us to assess the molecular characteristics of naturally  
120 replicating 5'TD EV-B RNA forms and secondly to identify RNA domain I structures  
121 responsible for IFN- $\beta$  pathway induction including antiviral genes such as ISG56.  
122 Moreover, we determined the major intra cytoplasmic innate immune sensor (RIG-I or  
123 MDA5) responsible for different 5'UTR complete or deleted RNA forms detection using  
124 knock-down STING-37 cells for each RLRs in a LGP2 dependent-manner. Finally, we  
125 demonstrate for the first time a RIG-I dependant sensing for major 5'TD EV-B RNA  
126 forms resulting in a down regulation of type I IFN response in human cells.

127 **Results:**

128

129 **5' terminally deleted EV-B RNA forms proportions and IFN- $\beta$  pathway activation**

130 Among selected EV-B-positive patients, we identified different viral genogroups and  
131 high viral load levels in accordance with a secondary viremia phase during acute  
132 infections (**Table 1**). Using a sensitive and specific rapid amplification of cDNA ends  
133 (RACE) PCR followed by micro-electrophoresis assay, we assessed EV-B RNA  
134 concentrations (**Figure 2A**) and the respective proportions of 5' full-length (FL) and  
135 5'TD RNA forms in peripheral blood samples (**Figure 2B and 2C**). Based on the extent  
136 of RNA deletions, the 5' TD viral populations can be distinguished as three subgroups  
137 resulting respectively in the loss of different RNA cloverleaf structures as the stem "a",  
138 the loss of stem "a", stem-loop "b," and in the loss of stem "a", stem-loop "b" ,"c" and  
139 part of stem-loop "d" (**Figure 2B and 2D**). Finally, we identified major EV-B populations  
140 characterized by 5'TD population ranging between 37-50 nt (91.8%) in length which  
141 was associated with minor proportions of 5'TD 15-36 nt (0.7%) and 5'TD 0-8 nt RNA  
142 forms (7.5%) considered as FL forms in peripheral blood of patients with an acute EV-  
143 B infection.

144

145 To assess the impact of 5' FL or TD EV-B population's proportions on type I IFN  
146 production levels, IFN mRNA levels were measured in the peripheral blood. (**Figure**  
147 **2**). Interestingly a positive correlation was observed between minor FL population  
148 associated with 5'TD 15-36 nt deleted EV-B RNA forms proportions and IFN- $\beta$  levels  
149 ( $R^2=0.538$ ;  $P=0.002$ ) (**Figure 2E**). By contrast, a negative correlation was observed  
150 between 37-50 nt deleted EV-B RNA forms proportion and IFN- $\beta$  levels ( $R^2=0.713$ ,  
151  $P<10^{-3}$ ) (**Figures 2F**). These results suggested that proportions of different 5' terminal

152 deletions of EV-B RNA forms could modulate IFN- $\beta$  response during acute infections.  
153 Subgroup analysis identified two distinct study patient populations displaying  
154 statistically different median levels of mRNA IFN- $\beta$  in peripheral blood, profile A and  
155 profile B (**Figure 2G**). These two distinct subgroups of patient's evidence different  
156 profiles of FL or 5'TD EV-B population's proportions (**Figure 2G**).

157

### 158 **Impact of 5'RNA EV-B forms proportions on type 1 interferon response in** 159 **cardiomyocytes**

160 To assess the impact of 5'TD RNA deletions on viral genomic replication activities,  
161 cultured human primary cardiomyocytes (HCM) were transfected with various mix of  
162 synthetic 15nt and 50nt 5'TD EV-B RNA forms and/or FL forms mimicking proportions  
163 observed in blood sample of patients with acute EV-B infections. We evidenced an  
164 active viral replication for the two mixed FL, 50nt 5'TD EV-B RNA forms with or without  
165 15nt 5'TD EV-B RNA forms after transfection in HCM. (**Figure 3A and 3B**). The two  
166 profiles of mixed EV-B RNA forms both displayed dynamic replication activities with a  
167 production of major encapsidated single-stranded RNA forms at 8 hours and minor  
168 non-encapsidated single-stranded RNA forms at 24 hours post-transfection in HCM  
169 (**Figure 3C, 3D and 3E**). Interestingly, these two distinct viral population profiles  
170 induced significantly different IFN- $\beta$  mRNA levels in cardiomyocytes (**Figure 3F**).

171

### 172 **RIG-I-dependent sensing of major 5'terminally deleted EV-B RNA forms**

173 To further evaluate the requirement of LGP2, MDA5 or RIG-I for various 5'TD RNA EV-  
174 B detection and type I IFN response, we used STING-37 cells depleted for LGP2, or  
175 MDA5, or RIG-I (**Figure 4A**)<sup>19</sup>. Upon full-length CVB-3 transfection only the cells that  
176 had RIG-I receptor silenced were strongly enhanced in ISRE (*Interferon stimulated*

177 *response element*) promoter activation while MDA5 silencing did not affect signaling.  
178 In contrast upon 5'TD EV-B forms with 50 nucleotides deletions (TD50) transfection,  
179 cells that silenced MDA5 receptor were strongly enhanced in ISRE promoter activation  
180 (**Figure 4B**). Moreover, when we associated 50nt 5'TD EV-B form with 15nt 5'TD EV-  
181 B forms and FL, ISRE activation is higher in cell that had RIG-I receptor silenced while  
182 when 50nt 5'TD EV-B forms only associated with FL, ISRE activation was higher in  
183 cell that had MDA5 receptor silenced (**Figure 4C**). Interestingly, innate sensing of 5'TD  
184 EV-B forms with deletions ranging from 8 to 36 nucleotides occurred only in cells that  
185 RIG-I receptor was silenced whereas 5'TD EV-B forms with deletion ranging from 36  
186 to 100 nucleotides strongly activate ISRE response in cells that MDA5 receptor was  
187 silenced (**Figure 4D**). These data validated the major role of MDA5 in viral sensing for  
188 FL and 5'TD EV-B forms deleted from 8 to 36 nucleotides. In contrary, RIG-I was  
189 implicated for viral sensing for 5'TD EV-B with deletion higher to 36 nucleotides.

190

### 191 **Stem-loop “d” secondary structure in RNA domain I is essential for IFN- $\beta$** 192 **pathway induction**

193 Since 5' terminal deletions EV-B RNA forms were associated with a modulation of IFN-  
194  $\beta$  response in acute EV-B infection, a key biological issue was to identify 5'NCR  
195 secondary-structural elements capable of regulating type 1 IFN activation pathway in  
196 human target cells (**Figure 5**). To identify the structure of domain I responsible of IFN-  
197  $\beta$  pathway induction, synthetic CVB-3 RNAs harboring 5' terminal mutation or deletions  
198 of each cloverleaves' stem-loops were generated *in vitro* transcribed and transfected in  
199 cultured primary cardiac cells (HCM) (**Figure 5A**). HCM transfection of synthetic FL  
200 and FL forms with stem-loop “c” (FL  $\Delta$ c) deletion induced the same levels of IFN- $\beta$  and  
201 ISG56 mRNA (**Figure 5B and 5C**). Interestingly, the loss of stem-loop “d” (FL  $\Delta$ d) alone

202 or the loss of stem-loop “c” associated with stem-loop “d” (FL  $\Delta$ c+d) reduced  
203 significantly IFN- $\beta$  and ISG56 mRNA levels in comparison to FL RNA form. Moreover,  
204 serial mutations from 46 to 50 nucleotides of RNA domain I that are located at the  
205 beginning of the stem-loop “d” secondary structure (**Figure 5A**), decreased  
206 significantly levels of IFN- $\beta$  and ISG56 mRNA comparatively to those observed with  
207 non-genetically modified FL RNA forms after transfection in HCM (**Figure 5B and 5C**).  
208 IFN- $\beta$  cytokine levels was quantified in the supernatant of HCM cells transfected by  
209 the same synthetic RNA forms and confirmed significant variations of IFN- $\beta$  mRNA  
210 levels following FL  $\Delta$ d and FL  $\Delta$ c+d viral RNAs transfection (**Fig 5B and 5D**). Overall,  
211 our findings indicated that 5’NCR stem-loop “d” of EV-B genomic RNA domain I  
212 (cloverleaf) contained a short sequential RNA nucleotide motif responsible for IFN- $\beta$   
213 pathway induction in HCM.

214 **Discussion:**

215

216 We identified major levels of peripheral blood EV-B 5'TD RNA forms in patients  
217 hospitalized for an EV-B related sepsis or myocarditis (**Table 1, Figure 2**). In  
218 accordance with recently reported 5'TD EV-B RNA forms<sup>5,18</sup>, we classified 5'TD RNA  
219 populations in three subgroups on the base of the extent of RNA deletions resulting  
220 respectively in the loss of different RNA cloverleaf structures (**Figure 2**). The respective  
221 proportions of minority and majority 5'TD RNA populations were positively or  
222 negatively correlated with IFN- $\beta$  levels. Statistical analyses of global distribution of IFN-  
223  $\beta$  levels evidenced two subgroups of patients displaying two distinct profiles of 5'NCR  
224 EV-B population's proportions which differentiated only by minority RNA forms with  
225 5'TD ranging from 15 to 36 nucleotides (**Figure 2**). Altogether, our data suggested that  
226 proportions of minor 5'TD RNA forms may differently modulate innate immune sensing  
227 mechanisms during acute human EV-B infections

228

229 We speculated that identified 5'RNA EV-B forms proportions in peripheral blood  
230 resulted from the lysis of EV-B infected target cells during acute infection therefore  
231 reflecting the global RNA forms released at the end of viral cycle replication. Upon  
232 transfection of synthetic CV-B3 RNAs harboring 5' terminal deletions in similar  
233 proportions to those observed in blood samples, we determined that the two profiles of  
234 mixed 5'TD EV-B RNA forms both displayed replication activities with a production of  
235 major encapsidated single-stranded RNA forms at 8 hours and minor non-  
236 encapsidated single-stranded RNA forms at 24 hours post-transfection in HCM (**Figure**  
237 **3**). As others, our experiments evidenced that these viral forms were low-level  
238 replicating viruses whose sustained genomic replication activities in target cells would

239 result from molecular cooperation mechanisms with other viral RNA populations <sup>34</sup>.  
240 Full-length or 8-36nt EV-B 5'TD viruses could act as helper virus, allowing 37-50nt EV-  
241 B 5'TD forms to replicate by providing the elements necessary for their replication as  
242 reported to occur in cell culture via DGV <sup>35,36,37</sup>. These 5'TD viral forms associated with  
243 8-36 nt 5'TD or FL viruses could reproduce *in vivo* a mode of viral replication that was  
244 reported to occur in cell culture via defective interfering (DI) particles <sup>35</sup>. Moreover, the  
245 presence of 5'TD forms with deletion ranging from 15 to 36 nucleotides in a mix of RNA  
246 forms (identified as profile B) induced a significant increase of IFN- $\beta$  mRNA levels at 8  
247 and 24 hours post-transfection in contrary to 5'TD RNA forms with 50 nucleotides  
248 deletions only associated with full-length RNAs (**Figure 3**). As observed in clinical  
249 samples, these two distinct viral populations' profiles impacted differentially onto the  
250 RNA IFN- $\beta$  levels in HCM validating our *in vitro* dynamic experimental cellular model  
251 developed to explore RLRs immune sensing of 5'TD RNA forms identified during  
252 viremia.

253

254 We validated FL EV-B RNA forms ability to activate MDA5 receptor as previously  
255 described in literature using STING-37 cells knock-down for each RLRs (**Figure 4**)  
256 <sup>24,26</sup>. Following validation of this *in vitro* system, we investigated innate sensing of 50  
257 nt deleted 5'TD RNA forms (TD50) after transfection in STING-37 knock-down cells.  
258 For the first time, we evidenced RIG-I-dependent sensing of these 5'TD EV-B RNA  
259 forms (**Figure 4**). We then investigated the RLR sensing for the two identified  
260 populations profiles transfected in STING-37 cells knockdown for each RLR,  
261 confirming the impact of the 5' terminal deletion length on RIG-I sensing. The difference  
262 between the two profiles observed in EV-B acute infection is the presence of 5' terminal  
263 deleted RNA form with deletion ranging from 8 to 36 nt associated with an increase

264 type I IFN response. To further understand the modulation of RLR sensing by these  
265 minority RNA forms, we explored ISRE pathway activation upon transfection of minor  
266 less than 36 nt deleted 5' terminal RNA forms. Interestingly, we evidenced MDA5  
267 sensing for 5'TD RNA forms with deletion ranging from 8 to 36 nt whereas a RIG-I-  
268 dependent sensing was observed for 5'TD RNA with deletion higher than 36  
269 nucleotides and therefore explaining the impact of RNA domain I secondary structures  
270 on RLRs dependent sensing.

271

272 Natural 46-50 nt deleted 5'TD RNA forms were never identified among EV-B  
273 populations in clinical samples or in experimental models whereas 50 nt deleted 5'TD  
274 RNA forms were major strongly suggesting that these deletions might provide a  
275 significant replication advantage in EV-B target cells. We therefore focused our  
276 investigations on a short RNA nucleotide motif composed of the first five nucleotides  
277 of the stem-loop "d" (**Figure 5**). Here, we showed for the first time that stem-loop "d" is  
278 indispensable for replication and recognition by sensors of innate immunity such as  
279 RLRs, independently of the stem-loop "c" (**Figure 5**). A mutation in this sequence  
280 impair the recognition of this motif by the RLRs and type I IFN pathway activation, thus  
281 modulating IFN- $\beta$  and ISG transcription and translation levels in infected cells, a  
282 potential way to overcome antiviral immune innate host response and to lead to the  
283 development of acute infection. This could result from a differential qualitative binding  
284 of 5'terminally deleted EV-B RNA sequences to the RLRs (RIG-I or MDA5) acting as  
285 major innate immune sensors for EV-B with positive or negative feedback from LGP2  
286 <sup>14,15,38</sup>.

287

288

289 Using a strategy based on the transfection of synthetic 5' terminally modified viral  
290 RNAs into human cardiac cells, we identified a short nucleotide RNA sequence located  
291 at the beginning of the stem-loop "d" structure of RNA domain I as an essential  
292 immunomodulatory motif responsible for IFN- $\beta$  pathway induction including antiviral  
293 genes such as ISG56 (**Figure 5**). To date, the interaction between RLRs and 5'TD EV-  
294 B RNA forms remains unknown and additional studies should be performed to obtain  
295 a clearer view on the similarities and the differences of RNA structures recognized by  
296 each of the three RLRs in EV-B infection. We are currently applying a One-STrEP-  
297 RLRs affinity chromatography purification to identified specific 5'TD EV-RNA  
298 sequences for RIG-I, MDA5 and LGP2 sensing. Finally our findings should stimulate  
299 the development of target immunotherapies to restore an efficient antiviral innate  
300 immune response by targeting the RLR pathway for the therapeutic control of EV viral  
301 infections.

302

### 303 **Material and methods:**

304 **Patient selection:** Peripheral blood samples (n=12) were collected in EDTA-sterile  
305 tubes between 2014 and 2017 and stored in UCH Reims (France) bio banks (-80°C)  
306 and were retrospectively selected because: (i) they were collected from  
307 immunocompetent patients demonstrating a final recorded clinical diagnosis of EV-B  
308 sepsis or myocarditis established according to ESC guidelines <sup>39</sup>; (ii) they were positive  
309 for EV-B RNA genome detection in peripheral blood; (iii) they were negative for the  
310 molecular detection of HHV1-HHV6, PVB19 and adenovirus genomes and for the  
311 classical detection of a bacterial sepsis in peripheral blood at the time of hospitalization.

312 Informed consent was obtained from the patients or subjects' families at the time of  
313 hospitalization or necropsy. Our investigations conformed to the principles outlined in  
314 the Declaration of Helsinki for use of human tissue or subjects.

315

#### 316 **Cells, virus strain and reagents**

317 Human primary CardioMyocytes (HCM, ScienCell Research Laboratories) were  
318 cultured in cardiac myocyte medium supplemented with 5% FBS (ScienCell Research  
319 Laboratories) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cardiac myocyte cell cultures were passaged twice  
320 a week and the cells were used for experiments between passages 3 to 9. CVB3/28  
321 virus strain was gift from Steve Stracy (University of Nebraska Lincoln, USA) <sup>40</sup>.

322 Hela cells were grown in minimum essential media (MEM) supplemented by 5ml  
323 Penicillin-streptomycin (PS) (Gibco, France), 5ml L-Glutamine and 10% Fetal Bovin  
324 serum (FBS) (ThermoFisher, France).

325 STING37shRLR (RIG-I, MDA5, LGP2 and Neg) cell lines were generated as previously  
326 described <sup>41</sup>. STING37shRLR were maintained in DMEM-Glutamax (GIBCO, Thermo  
327 Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) supplemented with 10% heat-inactivated  
328 FCS (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), and 100  
329 U/ml/100 mg/ml of Penicillin-Streptomycin (GIBCO). G418 antibiotic at 500 mg/ml  
330 (#G8168, SIGMA, St. Louis, Missouri) and puromycin (5 mg/ml) was added to the  
331 media to select properly transduced cells.

332

333 **Detection and quantification of viral RNA.** Reverse transcription was carried out  
334 using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). Detection of  
335 full-length RNA copy number in heart tissues and peripheral blood samples was

336 quantitated by RT-qPCR using a StepOne plus real time PCR system (ThermoFisher  
337 Scientific). Detection of viral RNA was performed using iQ Supermix (BioRad) and  
338 200nM NC1M primer (nt 456-474) (Fwd: 5'-CCCTGAATGCGGCTAATCC), 200nM E2  
339 primer (nt 582-601) (Rev: 5'- ATTGTCACCATAAGCAGCCA) and 100nM S-Ent probe  
340 (nt 539-566) (Fwd: 5'- FAM-AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-BHQ1). RT  
341 products were unhybridized at 94°C for 5min, and then cDNAs were amplified during 45  
342 cycles as follows: 94°C for 15sec, 63°C for 1min, and 68°C for 30sec. To validate  
343 detection and quantitation of EV sequences in clinical samples, serial dilutions of  
344 transcripts of wild-type CVB3 (CVB3/28 strain) clones were used as standard for  
345 qPCR.

346

#### 347 **Rapid amplification of cDNA ends-PCR (RACE PCR).**

348 Total RNA was extracted from blood samples taken from patients with acute  
349 myocarditis using QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen). Viral RNA (200ng) were reverse  
350 transcribed using Superscript II kit (Invitrogen, ThermoFisher) with 400nM AvCRev  
351 (Rev. :5'-AACAGGCGCACAAAGCTACCG)<sup>18</sup> and was incubated 5min at 65°C and  
352 then 5min on ice. The 5'extremity of cDNA was then ligated with 1X T4 DNA ligase  
353 buffer (Ambion, ThermoFisher), 50nM Trp1 DNA adaptor, 5 units of Ambion T4 DNA  
354 Ligase (Ambion, ThermoFisher) was added to the cDNA-mix and was incubated 24  
355 hours at 16°C<sup>42</sup>. Positive cDNA was amplified by a classical PCR reaction using KAPA  
356 Taq polymerase kit consisting of 1X KAPA TaqA buffer, 200µM dNTPs, 400nM  
357 AvCRev, 400nM Trp1, 1U KAPA Taq polymerase in a mix of 25µL with a cycling  
358 process composed of one cycle for 3min at 95°C, 40 cycles of 30s at 95°C, 30s at  
359 55°C, 30s at 72°C, finishing in a cycle of 30s at 72°C. A 2% agarose gel electrophoresis  
360 was performed in order to control the length of the PCR products. Amplicons were then

15

361 sized and quantified by Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analyses using Agilent High  
362 Sensitivity DNA Kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. The area of  
363 each relevant electrophoresis peak were integrated using software integrated analytic  
364 approach<sup>43-45</sup>. Viral populations deleted from less than 8 nucleotides were considered  
365 as full-length viral populations.

366

### 367 **Positive and Negative-Strand RNA Ratio**

368 Negative-strand RNA was isolated from total RNA molecules by annealing a  
369 biotinylated negative-strand specific primer (E3REV; 5'-  
370 GGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTG-3') and binding to streptavidin-labeled  
371 magnetic beads (Invitrogen, Life Technologies, Saint-Aubin, France). Purified  
372 negative-strand and total viral RNA molecules were quantified with a One-Step real-  
373 time RT-PCR assay using serial dilutions of the transcripts for the generation of the  
374 standard curves. The positive to negative strand viral RNA ratio was then determined  
375 using the following calculation: (total EV RNA – negative strand EV RNA)/negative  
376 strand EV RNA<sup>46</sup>.

377

### 378 **Single and Double-Strand RNA Ratio**

379 Double-strand EV-B RNA was isolated by digesting single-strand RNA with  
380 recombinant bacterial RNase A (ThermoScientific)<sup>47</sup>. A mix of 200ng of total RNA with  
381 1µl of RNase and buffer solution of NaCl at 0.3M, were incubated 10min at 25°C.  
382 Double-strand viral RNA copy number was quantified with a One-Step real-time RT-  
383 PCR assay using serial dilutions of the transcripts for the generation of the standard  
384 curves. The single-strand to double-strand viral RNA ratio was then determined using

16

385 the following calculation: (total EV RNA – double-strand EV RNA)/double-strand EV  
386 RNA.

387

### 388 ***In vitro* dephosphorylation assays**

389 The dephosphorylation of synthetic RNAs was carried out using Antarctic  
390 phosphatase (10 U), 1X Antarctic Phosphatase buffer (New England BioLabs GmbH,  
391 Frankfurt, Germany) and 2 µg of synthetic RNAs in a 20 µL final volume for 1h at  
392 37°C. Enzymes were inactivated at 80°C for 2 min. RNAs quality was controlled by  
393 loading 8 µL of each controls and dephosphorylation products by electrophoresis on  
394 1% agarose gel.

395

### 396 **Transfection**

397  $2.0 \times 10^5$  HCM, HeLa229 or STING37shRLR cells per well were seeded in 24-well  
398 plates (Nunclon delta surface, Thermo Scientific). The plates were incubated overnight  
399 at 37°C. Cells were washed with DPBS (Thermo Scientific). The transfection mixtures  
400 (0.1 mL) consisted of 1 µg of synthetic RNA and 1 µl of Lipofectamine 2000 (Thermo  
401 Scientific) in Opti-MEM Glutamax. The mixtures were incubated for 25 min at room  
402 temperature. Then 100 µl of the mixture was added to the cells, and plates were  
403 transferred to a cell incubator at 37°C for 8 or 24 hours. The supernatants were  
404 collected, and the cells lysed by 500 µL of TRI Reagent (Sigma–Aldrich Corporation,  
405 Lyon, France).

406

407

408 **Reverse transcription-quantitative PCR using SybrGreen® (RT-qPCR)**

409 RNA was extracted from cultured cells with TRI Reagent (Invitrogen, Life  
410 Technologies) and reverse transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase  
411 (RT) (Invitrogen Life Technologies) following to the manufacturer's instructions. cDNA  
412 was subjected to PCR using PowerUp SYBR Green Master Mix (2X) (ThermoFisher  
413 Scientific) to detect RIG-I, MDA-5, LGP2, IFN- $\beta$  and ISG56 expression. The primers  
414 used for PCR detection as follows: for human RIG-I, forward primer 5'-  
415 CCTACCTACATCCTGAGCTACAT-3' and reverse primer 5'-  
416 TCTAGGGCATCCAAAAGCCA-3', for human MDA5 , forward primer 5'-  
417 CCCAAGACACAGAATGAACAAA-3' and reverse primer 5'-  
418 CGAGACCATAACGGATAACAATGT-3', for human LGP2, forward primer 5'-  
419 ACGCGTTTGTAGCAACTGAAGG-3' and reverse primer 5'-  
420 CTCGGCCTGGTCCATTTTCTG-3', for human IFN- $\beta$ , forward primer 5'-  
421 AGCTGAAGCAGTTCAGAAAG-3' and reverse primer 5'-  
422 AGTCTCATTCCAGCCAGTGC-3'; human ISG56, forward primer  
423 5'TCCCCTAAGGCAGGCTGTC-3' and reverse primer 5'-  
424 GACATGTTGGCTAGAGCTTCTTC-3'. Primers specific to glyceraldehyde-3-  
425 phosphate dehydrogenase (GAPDH) (forward primer  
426 5'AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3' and reverse primer 5'-  
427 CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3') was served as the internal control. PCR was  
428 carried out in StepOnePlus Real-Time PCR Systems (ThermoFisher Scientific)  
429 programmed as follows: denaturation step at 94°C for 15s, annealing step at 63°C for  
430 10 s, and extension step at 72°C for 15 s for a total of 40 cycles, before melting curve.  
431 Results were analyzed by the  $\Delta\Delta CT$  method, where CT is threshold cycle, and  
432 normalized to GAPDH mRNA. Data are represented as levels of mRNA relative to that

433 of the mock transfected control samples and are displayed as the means  $\pm$  SD of  
434 results from at least three independent experiments.

435

#### 436 **Quantitative ELISA assays for IFN- $\beta$ .**

437 For the quantitative determination of human IFN- $\beta$  concentrations in supernatants of  
438 cultured cells, ELISA assays using commercially available Human IFN-beta DuoSet  
439 ELISA kits (R&D Systems, France) were performed according to the manufacturer's  
440 instructions.

441

#### 442 **Immunostimulatory activity**

443 STING-37 shRLR cells ( $2 \times 10^5$  per well) were plated in a 24-well plate and transfected  
444 with FL and 5'TD forms. At 24 hours post-transfection, cells were lysed by Passive  
445 Lysis buffer (E1941, Promega, Fitchburg, Wisconsin), and luciferase activity was  
446 measured with Bright-Glow Luciferase assay system (E2650, Promega) by FLUOstar  
447 Omega (BMG Labtech).

448

#### 449 **Statistical analysis**

450 All statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 7 (Graph Pad, Prism)  
451 and SAS version 9.4 (SAS Institute Inc.). Quantitative variables were compared using  
452 the Mann Whitney U test and a P-value  $< 0.05$  was considered as statistically  
453 significant. Linear regression was performed, and slopes were compared using  
454 Spearman correlation test.

455

456

457 **Data availability**

458 We declare that all the data supporting the findings of this study are available within  
459 the paper and the Supplementary Information files.

460 The study materials will not be made available to other researchers for purposes of  
461 reproducing the results or replicating the procedure, because the human biological  
462 samples (peripheral blood samples) as well as RNA extracted from human primary  
463 cardiomyocytes used in our experiments remain limited biological sources.

464

465 **Acknowledgments**

466 The authors thank the staff at the collaborating clinical sites and references laboratory.  
467

468 **Author contributions**

469 L. A. conceived the clinical and immune study. Y.N, S.R, V-G.R established the cohort  
470 and supervised data collection. M.G, A-L.L and D.C performed the laboratory testing,  
471 supervised by L.A and A.K; Y.N. performed the statistical analyses supervised by L.A.,  
472 and M.G; L.A., A.K, M.G contributed to the interpretation of the results. L. A. and M. G  
473 wrote the manuscript. L.A, A.K, M.G, A-L, F.B, F.T, V.N, provided valuable input to  
474 interpretation of the data and critically reviewed the manuscript for important  
475 intellectual content. All authors reviewed and approved the final version of the  
476 manuscript.

477

478

479

480

481 **Financial support**

482 This work was supported by grant from the “Fédération Française de Cardiologie” (FFC  
483 grant 2019 “Etude CardioVir”) and by a local research grant for emerging research  
484 teams from the University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), France. M.G. is  
485 supported by a University of Reims Champagne-Ardenne (URCA) PhD grant.

486

487 **Competing interests**

488 The authors declare non-competing interest.

489 **Tables and Figures**

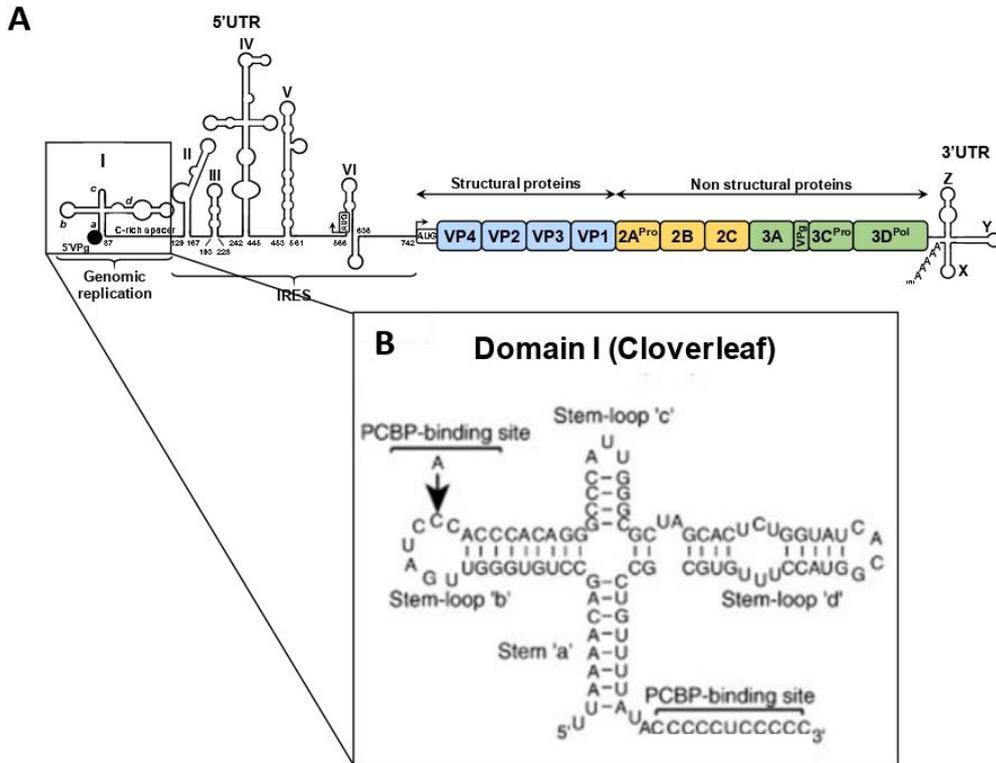
490

491 **Table 1:** Demographic, clinical and virological data from study patients sampled at the  
492 time of second viremia.

Patient number	Sexe	Age	Delay of symptoms (days)	Viral load (cp/mL)	VP1 Genotyping	GenBank access number	Pathology
1	M	4 (days)	5	6,87E+07	E11	MK281350	Myocarditis
2	M	15 (days)	3	1,68E+05	CVB5	MK2811345	Sepsis
3	M	0.25 (years)	7	2,98E+07	E5	n.d	Sepsis
4	M	0.39 (years)	2	3,23E+07	E5	n.d	Sepsis
5	F	-	6	3,30E+05	CVB3	n.d	Sepsis
6	M	22 (years)	-	2,27E+05	CVB3	MK561368	Myocarditis
7	M	7 (days)	1	1,68E+05	CVB3	MK561371	Myocarditis
8	F	32 (years)	30	3,15E+05	CVB5	MK281347	Myocarditis
9	M	-	-	1,31E+07	CVB4	MK561365	Myocarditis
10	F	15 (days)	4,5	8,60E+03	E9	MK281348	Myocarditis
11	M	7 (days)	1	5,00E+04	CVB3	MK561372	Myocarditis
12	M	29 (days)	2	4,63E+04	CVB3	MK561375	Sepsis

493

494 *Footnotes: VP1 genotyping performed with extracted RNA from peripheral blood samples. M: Male, F:*  
495 *Female, E: Echovirus, CVB: Coxsackievirus. n.d: non-determined*

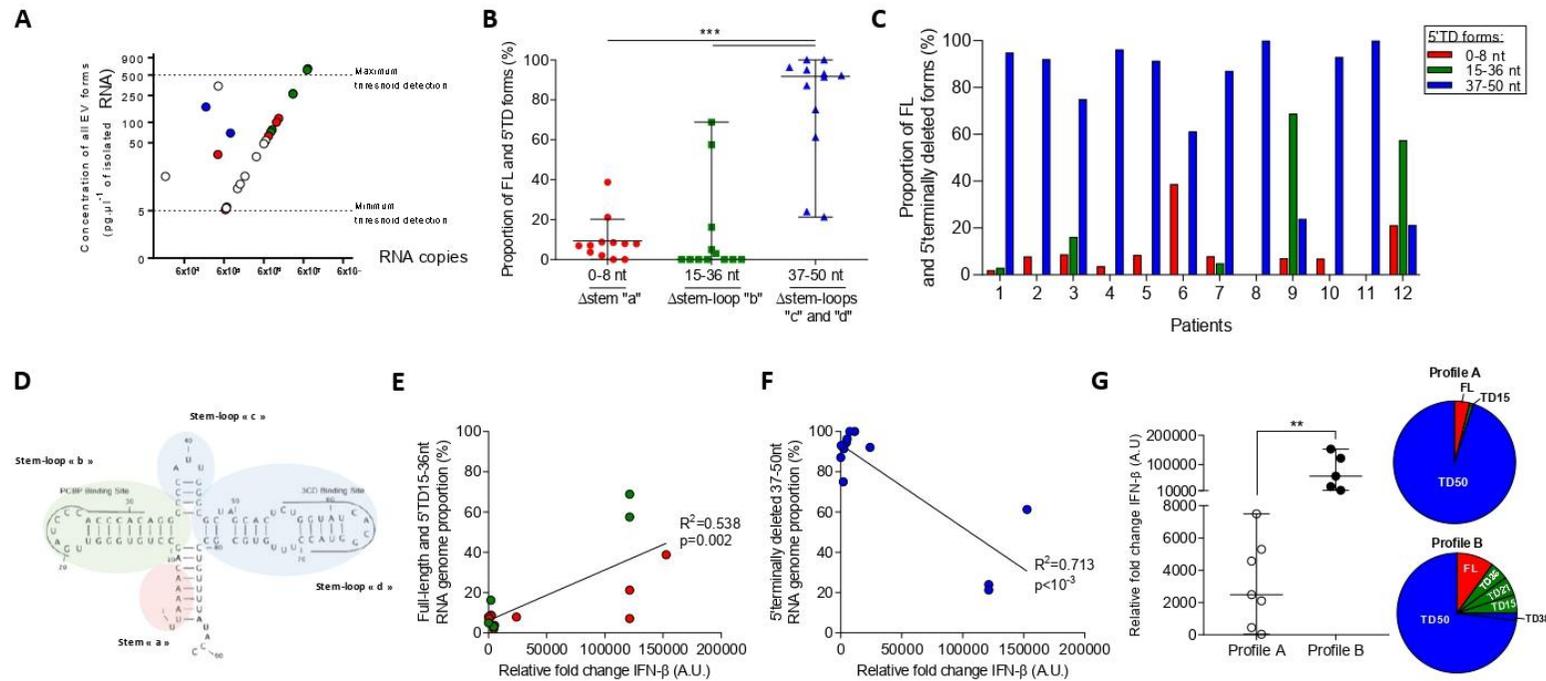


497

498 **Figure 1: Domain I schematic organization of genomic RNA of Enteroviruses.**

499

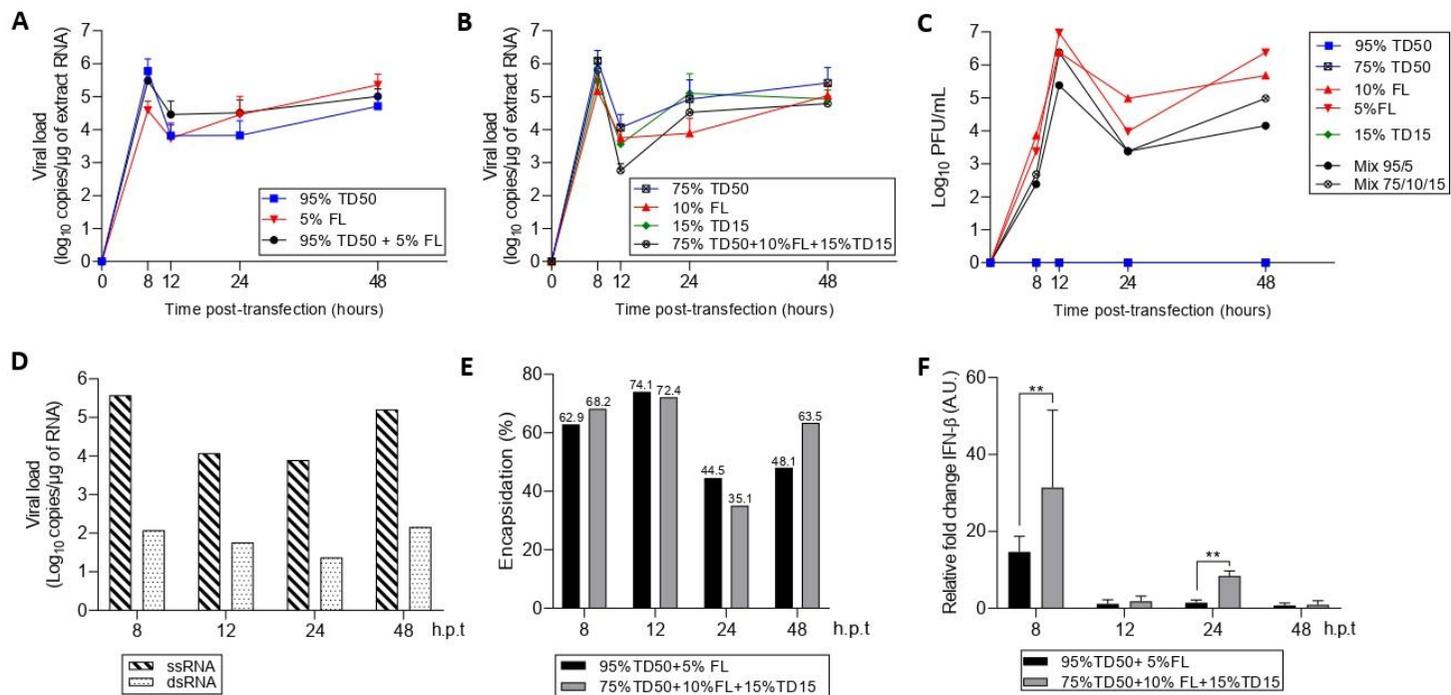
500 **A.** Organization of viral genomic RNA into P1, P2 and P3 regions coding respectively for the proteins  
 501 VP1 to VP4, P2A to P2C and P3A to P3D. The coding region is surrounded by 2 non-coding regions in  
 502 extremity 5' and 3' involved in the regulation of replication and translation. This coding region encodes  
 503 structural proteins (4 capsid proteins from VP1 to VP4) and non-structural proteins (viral proteases and  
 504 polymerases). The 7 stem-loop structures of the 5'NC region are noted from I to VII. Domain I represent  
 505 the initiation site of genomic replication. Domains II to VII constitute the region of the Internal Ribosome  
 506 Entry Site (IRES) necessary for translation. The position of the AUG codon correspond to initiation of  
 507 the coding region. **B.** Schematization of domain I. The 5'NC region of enteroviruses (EV) consists of a  
 508 cloverleaf structure composed of stem « a » and three stem-loops « b », « c » and « d » constituting the  
 509 site of initiation of genomic replication. Representation of PCBP binding sites on stem-loop b and the  
 510 last part of stem-loop d, Cytosine-rich sequence (C). 5'NC : 5'non-coding region ; 3'NC : 3'non-coding  
 511 region ; VPg, *Viral Protein genome linked* ; IRES, *Internal Ribosome Entry Site* ; AAAA polyadenylated  
 512 tail



513

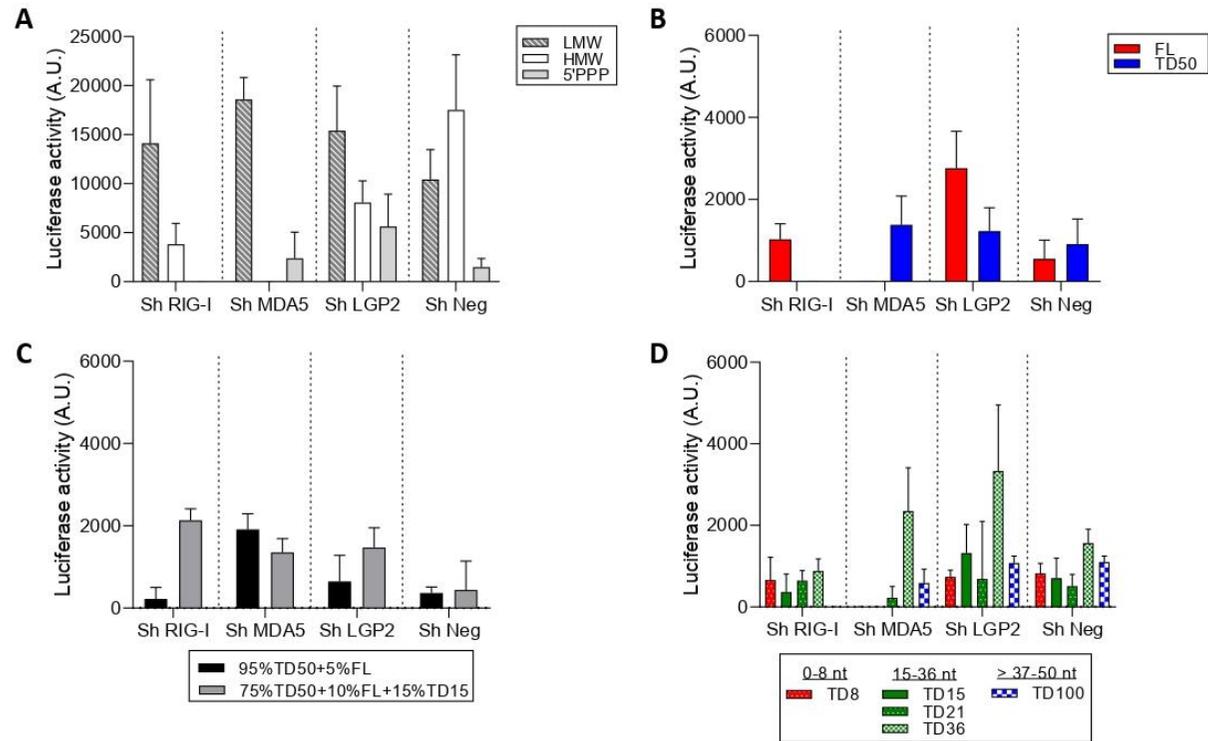
514 **Figure 2: Quantitative detection of undeleted and 5' terminally deleted EV-B populations and IFN beta levels in clinical samples.**

515 **A.** Linear regression curve between RNA copies detected per  $\mu\text{L}$  of total RNA and concentration of FL and 5'TD forms of detected RNA in blood samples ( $n=12$ ). Linear  
 516 regression was performed, and slopes were compared using Spearman test. **B.** Proportion of 5'TD forms (15-36 nt and 37-50 nt) and FL form in blood samples. Data represent  
 517 the mean  $\pm$  SD. Viral populations deleted from less than 8 nucleotides were considered as full-length viral populations. **C.** Identification of FL and 5'TD EV-B and proportion of  
 518 each 5'TD forms of study samples. **D.** Two-dimensional representation of the EV-B 5' non-coding region (NCR) RNA sequences inducing a cloverleaf replant with a stem "a",  
 519 and three stem-loop "b", "c" and "d" essential for EV-B replication. **E.** correlation between full-length (Red circle) associated with 5'terminally deleted 15-36 nt (Green circle)  
 520 RNA genome proportion (%) and relative fold change of IFN- $\beta$  (A.U.) ( $n=12$ ). **F.** correlation between 5'terminally deleted 37-50 nt (Blue circle) RNA genome proportion (%) and  
 521 relative fold change of IFN- $\beta$  (A.U.) ( $n=12$ ). **G.** IFN- $\beta$  semi-quantitative RT-qPCR analysis in profile A and profile B blood samples expressed as fold change over control patients  
 522 after normalization to housekeeping mRNA expression. Data represent the mean  $\pm$  SD. **\*\*** $P < 0.01$  according to Mann-Whitney U test. Linear regression were performed, and  
 523 slopes were compared using Spearman test. *FL, full-length; TD, terminally deleted, bp, base paired, nt, nucleotides.*



**Figure 3: RNA genomic replication capacities and viral properties of EV-B 5'terminally deleted populations**

Synthetic RNAs (1 $\mu\text{g}$ ) of full-length (FL) or deleted of fifty 5' terminal nucleotides (TD50) of CV-B3/28 forms were transfected alone or in association (95% of TD50 associated with 5% of FL or 75% of TD50 associated with 15% of TD15 and 10% of FL) in human primary cardiomyocytes (HCMs). **A and B.** Viral RNA genomic replication activity (total viral RNA [intracellular and extracellular production]) was assessed with a reverse transcription–quantitative polymerase chain (RT–qPCR) assay at 0, 8, 12, 24, and 48 hours after transfection. Data represent the mean  $\pm$  SD. **C.** Analysis of intracellular and extracellular infectious particle production at 0, 8, 12, 24, and 48 hours after transfection (n=3). **D.** Quantification (RT–qPCR) of double-strand and single-strand viral RNA copy number ( $\log_{10}$ ) after RNase A digestion of CVB3/28 synthetic RNA. Data present mean  $\pm$  range. **E.** Quantification (RT–qPCR) of viral RNA copy number ( $\log_{10}$ ) after proteinase K digestion of CVB3/28 synthetic RNA. **F.** IFN- $\beta$  semi-quantitative RT–qPCR analysis in cardiomyocytes expressed as fold change over control patients after normalization to housekeeping mRNA expression. Data represent the mean  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$  according to Mann-Whitney U test. CVB3/28 RNA, full-length form (FL) and deleted CVB3/28 forms of 15 and 50 nucleotides (TD15 and TD50).

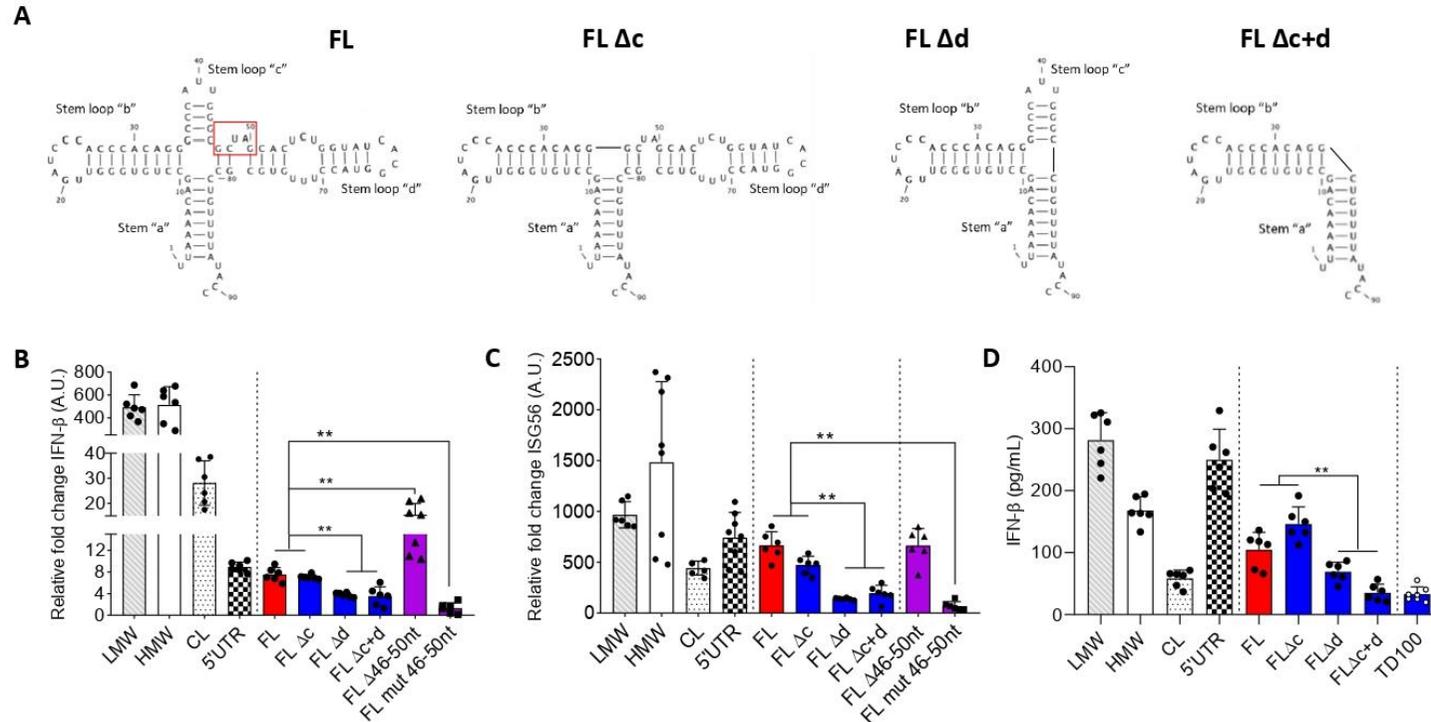


536  
537

538 **Figure 4: Innate sensing of full-length or various 5'terminally deleted EV-B by different RLRs.**

539

540 STING-37 reporter cell line was transduced by lentiviral vectors expressing a shRNA directed against either LGP2 (shLGP2), or MDA5 (shMDA5), or RIG-I (shRIG-I), or non-  
541 silencing (shNeg). Analysis of STINGshRLR promoter activity in the presence of synthetic EV-B RNA of (A) Positive controls ( B) full-length (FL) or 5'terminally deleted EV-B  
542 forms with 50 nucleotides deletions (TD50) (C) or 5'terminally deleted EV-B forms in the same proportion of profile A or B (D) or minor 5'terminally deleted EV-B forms with  
543 deletions from 8 to 100 nucleotides. Luciferase activity was measured 24 hour post-transfection and normalized by setting mock-transfected as 100% of ISRE background  
544 activity for the corresponding cell line. *HMW*, poly(I:C) high molecular weight; *LMW*, low molecular weight; *FL*, full-length; *CL*, cloverleaf; *5'NC*, 5'non-coding region; *TD*,  
545 terminally deleted, *bp*, base paired, *nt*, nucleotides.



547  
548  
549

**Figure 5: Identification of EV-B genomic domain I structures responsible for IFN- $\beta$  pathway induction in human cardiac cells.**

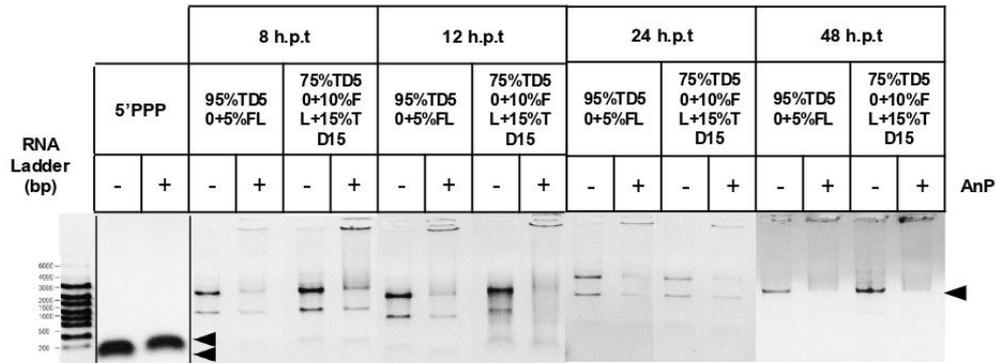
550 **A.** Two-dimensional representation of the EV-B 5'-non-coding region (NCR) RNA sequences inducing a cloverleaf replant with a stem "a", and three stem-loop "b" to "d" essential  
551 for EV-B replication. Full-length EV-B forms which lost stem-loop "c" (FL  $\Delta$ c), FL with the loss of stem-loop "d" (FL  $\Delta$ d) and FL with the loss of stem-loop "c" and "d" (FL  $\Delta$ c+d).  
552 **B and C.** IFN- $\beta$  and ISG56 semi-quantitative RT-qPCR results were expressed as fold change over mock transfected cells after normalization to housekeeping mRNA  
553 expression. **D.** IFN- $\beta$  levels were quantified by ELISA in supernatants of cardiomyocytes cells at 24 hours' post-transfection of various EV-B RNA forms. Data represent mean  
554 +/- SD (n=3) (Mann-Whitney U test; \*\*: p<0.01). *Positive controls:* CL: Cloverleaf; 5'UTR: 5'untranslated transcribed region; LMW: poly(I:C) low molecular weight; HMW:  
555 poly(I:C) high molecular weight. FL, full-length; CL, cloverleaf; 5'NC, 5'non-coding region; TD, terminally deleted, bp, base paired, nt, nucleotides.

556 **Supplementary data**

557

558

559



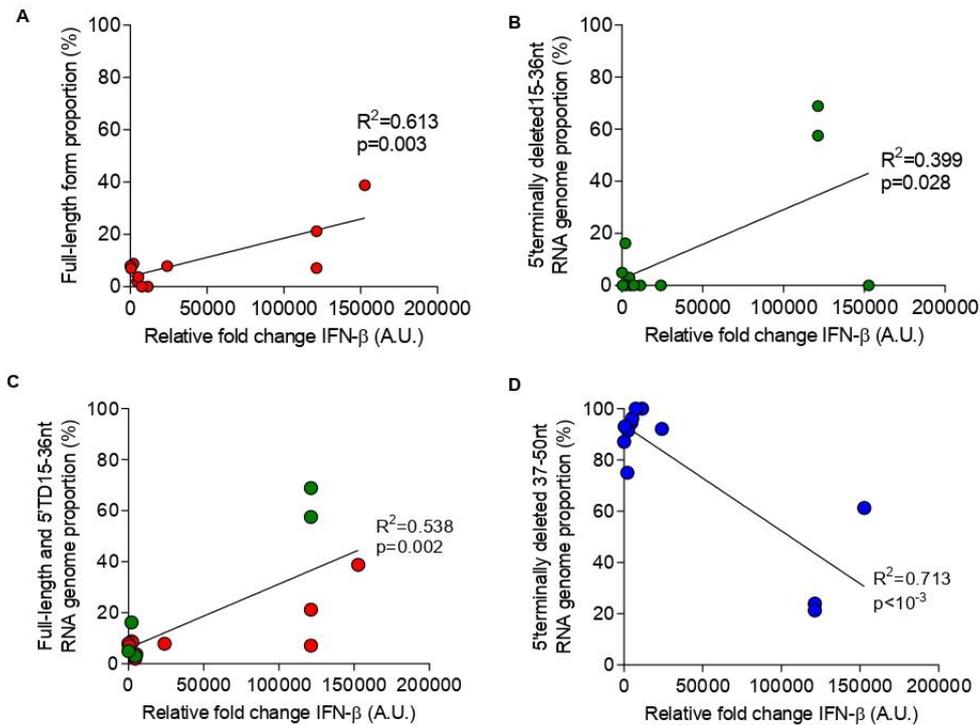
560

561

562 **Figure S1: Phosphorylation analysis of RNA mixture proportion of full-length**  
 563 **and 5'terminally deleted EV-B forms**

564

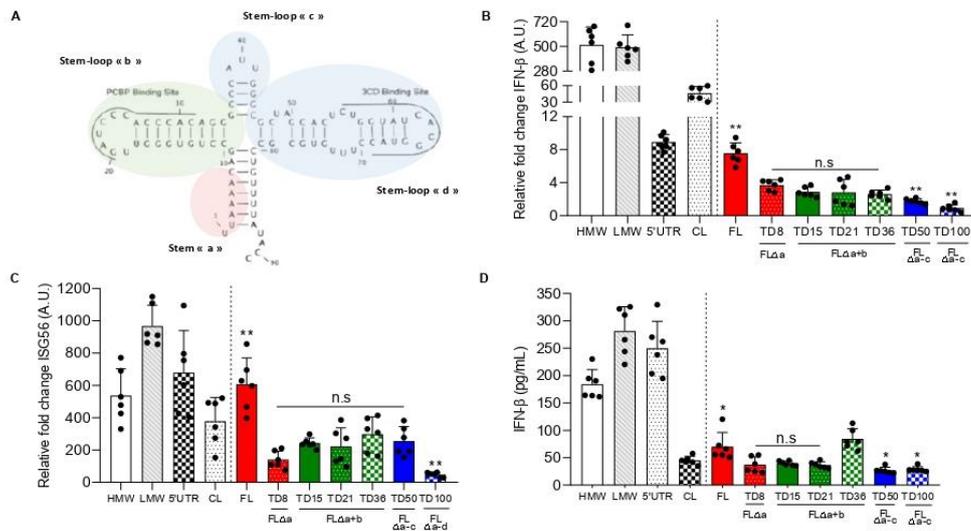
565 Synthetic RNA of mixture proportion of full-length (FL) and 5'terminally deleted EV-B forms with deletion  
 566 of 50 nucleotides (TD50), 15 nucleotides (TD15) for 8, 12, 24 or 48 hours post-transfection were  
 567 untreated or treated by Antarctic Phosphatase (AnP). Result of synthetic RNA forms treatment by AnP  
 568 was visualized using 1% agarose gel electrophoresis.



569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581

**Figure S2: Relationships between EV-B full-length or identified EV-B 5'terminally deleted population proportions and type I IFN levels.**

**A.** FL form proportion (%) (red) correlation between relative fold change of IFN- $\beta$  (A.U.) (n=12). **B.** 5'terminally deleted 15-36 nt RNA genome proportion (%) (green) correlation between relative fold change of IFN- $\beta$  (A.U.) (n=12). **C.** Full-length (red) associated with 5'terminally deleted 15-36 nt (green) RNA genome proportion (%) correlation between relative fold change of IFN- $\beta$  (A.U.) (n=12). **D.** 5'terminally deleted 37-50 nt (blue) RNA genome proportion (%) correlation between relative fold change of IFN- $\beta$  (A.U.) (n=12). Linear regression were performed, and slopes were compared using Spearman test. *FL*, full-length; *TD*, terminally deleted.



582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596

**Figure S3: IFN-β mRNA and cytokine secretion by human cardiomyocytes transfected with full-length or various 5'terminally deleted RNA forms.**

**A.** Two-dimensional representation of the EV-B 5' non-coding region (NCR) RNA sequences inducing a cloverleaf replant with a stem "a", and three stem-loop "b", "c" and "d" essential for EV-B replication. **B and C.** IFN-β and ISG56 semi-quantitative RT-qPCR results were expressed as fold change over mock transfected cells after normalization to housekeeping mRNA expression. Data represent mean +/- SD (n=3) (Mann-Whitney U test; \*\*: p<0.01 and n.s: non-significant). **D.** IFN-β levels were quantified by ELISA in supernatants of cardiomyocytes cells at 24 hours' post-transfection of various EV-B RNA forms. Data represent mean +/- SD (n=3) (Mann-Whitney U test; \* p<0.05 and n.s: non-significant). *CVB3/28 RNA, full-length form (FL) and deleted CVB3/28 forms of 8, 15, 21, 36, 50, 100 nucleotides (TD8, TD15, TD21, TD36, TD50 and TD100); Positive controls: CL: Cloverleaf; 5'UTR: 5'untranslated transcribed region; LMW: low molecular weight; HMW: high molecular weight).*

597 **References**

- 598 1. LUCAS, M., KARRER, U., LUCAS, A. & KLENERMAN, P. Viral escape mechanisms –  
599 escapology taught by viruses. *Int. J. Exp. Pathol.* **82**, 269–286 (2001).
- 600 2. Baron, S., Fons, M. & Albrecht, T. Viral Pathogenesis. in *Medical Microbiology* (ed. Baron,  
601 S.) (University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996).
- 602 3. Vidalain, P.-O. & Tangy, F. Virus-host protein interactions in RNA viruses. *Microbes*  
603 *Infect.* **12**, 1134–1143 (2010).
- 604 4. Vignuzzi, M. & López, C. B. Defective viral genomes are key drivers of the virus-host  
605 interaction. *Nat. Microbiol.* **4**, 1075–1087 (2019).
- 606 5. Bouin, A. *et al.* Enterovirus Persistence in Cardiac Cells of Patients With Idiopathic Dilated  
607 Cardiomyopathy Is Linked to 5' Terminal Genomic RNA-Deleted Viral Populations With  
608 Viral-Encoded Proteinase Activities. *Circulation* **139**, 2326–2338 (2019).
- 609 6. Genoni, A. *et al.* Revealing enterovirus infection in chronic human disorders: An integrated  
610 diagnostic approach. *Sci. Rep.* **7**, 5013 (2017).
- 611 7. Tracy, S., Smithee, S., Alhazmi, A. & Chapman, N. Coxsackievirus can persist in murine  
612 pancreas by deletion of 5' terminal genomic sequences: Coxsackievirus Persistence in the  
613 Pancreas. *J. Med. Virol.* **87**, 240–247 (2015).
- 614 8. Tam, P. E., Fontana, D. R. & Messner, R. P. Coxsackievirus B1–induced chronic  
615 inflammatory myopathy: differences in induction of autoantibodies to muscle and nuclear  
616 antigens by cloned myopathic and amyopathic viruses. *J. Lab. Clin. Med.* **142**, 196–204  
617 (2003).
- 618 9. Racaniello, V. R. Picornaviridae : The viruses and Their Replication. in *Fields Virology*  
619 vol. 1 795–838 (Knipe & Howley, 2007).
- 620 10. Baggen, J., Thibaut, H. J., Strating, J. R. P. M. & Kuppeveld, F. J. M. van. The life cycle  
621 of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 368–381 (2018).

- 622 11. Ertel, K. J., Brunner, J. E. & Semler, B. L. Mechanistic consequences of hnRNP C binding  
623 to both RNA termini of poliovirus negative-strand RNA intermediates. *J. Virol.* **84**, 4229–  
624 4242 (2010).
- 625 12. Brunner, J. E., Ertel, K. J., Rozovics, J. M. & Semler, B. L. Delayed kinetics of poliovirus  
626 RNA synthesis in a human cell line with reduced levels of hnRNP C proteins. *Virology* **400**,  
627 240–247 (2010).
- 628 13. Jaramillo, L., Smithee, S., Tracy, S. & Chapman, N. M. Domain I of the 5' non-translated  
629 genomic region in coxsackievirus B3 RNA is not required for productive replication.  
630 *Virology* **496**, 127–130 (2016).
- 631 14. Feng, Q. *et al.* MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-  
632 infected cells. *Cell Rep.* **2**, 1187–1196 (2012).
- 633 15. Feng, Q. *et al.* Coxsackievirus Cloverleaf RNA Containing a 5' Triphosphate Triggers an  
634 Antiviral Response via RIG-I Activation. *PLoS ONE* **9**, e95927 (2014).
- 635 16. Lévêque, N. *et al.* Functional Consequences of RNA 5'-Terminal Deletions on  
636 Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *J. Virol.*  
637 **91**, (2017).
- 638 17. Chapman, N. M., Kim, K.-S., Drescher, K. M., Oka, K. & Tracy, S. 5' terminal deletions  
639 in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. *Virology*  
640 **375**, 480–491 (2008).
- 641 18. Bouin, A. *et al.* Major Persistent 5' Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in  
642 Human Endomyocardial Tissues. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1488–1490 (2016).
- 643 19. Wessely, R., Klingel, K., Knowlton, K. U. & Kandolf, R. Cardiospecific infection with  
644 coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and  
645 early viral replication. *Circulation* **103**, 756–761 (2001).

- 646 20. Binder, M. *et al.* Molecular mechanism of signal perception and integration by the innate  
647 immune sensor retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I). *J. Biol. Chem.* **286**, 27278–27287  
648 (2011).
- 649 21. Feng, Q. *et al.* Coxsackievirus cloverleaf RNA containing a 5' triphosphate triggers an  
650 antiviral response via RIG-I activation. *PLoS One* **9**, e95927 (2014).
- 651 22. Rehwinkel, J. & Gack, M. U. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA  
652 sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 1–15 (2020) doi:10.1038/s41577-020-0288-3.
- 653 23. Mukherjee, A. *et al.* The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to  
654 attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog.* **7**, e1001311 (2011).
- 655 24. Wang, J. P. *et al.* MDA5 and MAVS mediate type I interferon responses to coxsackie B  
656 virus. *J. Virol.* **84**, 254–260 (2010).
- 657 25. Fuse, K. *et al.* Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of  
658 Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production.  
659 *Circulation* **112**, 2276–2285 (2005).
- 660 26. Feng, Q. *et al.* MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-  
661 infected cells. *Cell Rep.* **2**, 1187–1196 (2012).
- 662 27. Wang, J. P., Asher, D. R., Chan, M., Kurt-Jones, E. A. & Finberg, R. W. Cutting Edge:  
663 Antibody-mediated TLR7-dependent recognition of viral RNA. *J. Immunol. Baltim. Md*  
664 *1950* **178**, 3363–3367 (2007).
- 665 28. Hardarson, H. S. *et al.* Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress  
666 response in virus-induced cardiac injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H251-  
667 258 (2007).
- 668 29. Feng, Q. *et al.* Enterovirus 2Apro targets MDA5 and MAVS in infected cells. *J. Virol.* **88**,  
669 3369–3378 (2014).

- 670 30. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded  
671 RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**, 730–737 (2004).
- 672 31. Reikine, S., Nguyen, J. B. & Modis, Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of  
673 RIG-I and MDA5. *Front. Immunol.* **5**, 342 (2014).
- 674 32. Mura, M. *et al.* Nonencapsidated 5' Copy-Back Defective Interfering Genomes Produced  
675 by Recombinant Measles Viruses Are Recognized by RIG-I and LGP2 but Not MDA5. *J.*  
676 *Virol.* **91**, e00643-17 (2017).
- 677 33. Bruns, A. M. & Horvath, C. M. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA  
678 recognition and antiviral signaling. *Cytokine* **74**, 198–206 (2015).
- 679 34. Shirogane, Y., Watanabe, S. & Yanagi, Y. Cooperation between different variants: A  
680 unique potential for virus evolution. *Virus Res.* **264**, 68–73 (2019).
- 681 35. Vignuzzi, M. & López, C. B. Defective viral genomes are key drivers of the virus–host  
682 interaction. *Nat. Microbiol.* **4**, 1075–1087 (2019).
- 683 36. Holmblat, B. *et al.* Nonhomologous Recombination between Defective Poliovirus and  
684 Coxsackievirus Genomes Suggests a New Model of Genetic Plasticity for Picornaviruses.  
685 *mBio* **5**, e01119-14 (2014).
- 686 37. Muslin, C., Joffret, M.-L., Pelletier, I., Blondel, B. & Delpeyroux, F. Evolution and  
687 Emergence of Enteroviruses through Intra- and Inter-species Recombination: Plasticity and  
688 Phenotypic Impact of Modular Genetic Exchanges in the 5' Untranslated Region. *PLOS*  
689 *Pathog.* **11**, e1005266 (2015).
- 690 38. Reikine, S., Nguyen, J. B. & Modis, Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of  
691 RIG-I and MDA5. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
- 692 39. Caforio, A. L. P. *et al.* Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management,  
693 and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology

- 694 Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* **34**, 2636–2648,  
695 2648a–2648d (2013).
- 696 40. Tu, Z. *et al.* The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single  
697 site in the genomic 5' nontranslated region. *J. Virol.* **69**, 4607–4618 (1995).
- 698 41. Sanchez David, R. Y. *et al.* Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-  
699 I-like receptors. *eLife* **5**, e11275 (2016).
- 700 42. Bouin, A. *et al.* Major Persistent 5' Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in  
701 Human Endomyocardial Tissues. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1488–1490 (2016).
- 702 43. Panaro, N. J. *et al.* Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent  
703 2100 bioanalyzer. *Clin. Chem.* **46**, 1851–1853 (2000).
- 704 44. Nachamkin, I. *et al.* Agilent 2100 bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism  
705 analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 754–757 (2001).
- 706 45. Lu, C.-Y., Tso, D.-J., Yang, T., Jong, Y.-J. & Wei, Y.-H. Detection of DNA mutations  
707 associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer. *Clin. Chim. Acta Int.*  
708 *J. Clin. Chem.* **318**, 97–105 (2002).
- 709 46. Lévêque, N. *et al.* Quantitative Genomic and Antigenomic Enterovirus RNA Detection in  
710 Explanted Heart Tissue Samples from Patients with End-Stage Idiopathic Dilated  
711 Cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3378–3380 (2012).
- 712 47. Wang, P.-H. *et al.* RNase If -treated quantitative PCR for dsRNA quantitation of RNAi trait  
713 in genetically modified crops. *BMC Biotechnol.* **18**, (2018).
- 714

## **DISCUSSION GENERALE**

Les Entérovirus (EVs) sont des agents pathogènes ubiquitaires et communs qui présentent une grande diversité génétique leur conférant la capacité d'infecter différents tissus humains <sup>311</sup>. En réponse à l'infection par ces virus à ARN (+), des mécanismes de défense immunitaire se mettent en place via une réponse innée immédiate dépendante de l'activation des voies de signalisation des interférons de type I et façonnent la réponse immunitaire adaptative <sup>312</sup>. Ces virus à ARN présentent une grande variabilité ou « plasticité » génétique qui leur confère la capacité de mettre en place différentes stratégies visant à d'échapper à la surveillance du système immunitaire <sup>7</sup>. Parmi ces mécanismes viraux visant à contourner les défenses de l'hôte on connaît : (i) la non-reconnaissance des ARN viraux par les molécules du CMH de classe I; (ii) l'inhibition de la voie apoptotique NFkB et (iii) la synthèse de protéinases virales capables de cliver les facteurs cellulaires modulant la réponse interféron de type I.

En 2008, les premières formes virales tronquées en région 5'NC ont été mises en évidence chez l'Homme à partir d'une souche de virus Coxsackie de type B2 (CVB-2) détectée dans des biopsies cardiaques d'un patient japonais décédé d'une myocardite fulminante. Ces délétions identifiées suppriment une structure secondaire du domaine I de l'ARN génomique, la tige boucle « b », qui est le site de fixation du facteur de réplication cellulaire PCBP. Ces délétions reproduites dans des ARN viraux synthétiques de CVB-3 diminuent ainsi la capacité de réplication génomique *in vitro* et *in vivo* chez la souris <sup>313,314</sup>. En 2016, des formes virales majoritaires tronquées jusqu' à 50 nucléotides en région 5'NC associées à des formes complètes minoritaires ont été caractérisées par une approche de séquençage haut débit (NGS) chez une patiente présentant une cardiomyopathie dilatée (CMD). Ces données publiées par notre groupe ont été confirmés par nos travaux lors de l'étude d'une cohorte de patients atteints de CMD. Ainsi la présence de ces formes virales tronquées dans les biopsies cardiaques dans les phases aiguës et chroniques de cardiomyopathies humaines suggère qu'il s'agit de facteurs physiopathologiques clés dans le développement à infections à EV-B. Ces formes tronquées en région 5'NC sont faiblement répliquatives et elles ont besoin de formes virales minoritaires présentant un génome viral complet jouant un effet facilitateur (virus « helper ») ce qui les classent dans la catégorie des virus à génomes viraux défectifs (en anglais *Defective viral genomes*, DVGs). Ces DVGs pourraient en se répliquant à bas bruit générer des ARN génomiques viraux de polarité négative ou double brins majoritaires qui

« encapsidés » ne produiraient pas d'effet cytopathogène détectables en utilisant les techniques classiques de culture cellulaires. L'émergence de ces populations virales tronquées en association avec des populations virales à ARN complet permettrait d'expliquer la persistance des EVs dans les tissus cardiaques. La persistance de ces populations virales tronquées a été associée des activités de la protéinase virale 2A responsable du clivage de la dystrophine et au développement d'une pathologie cardiaque chronique comme la CMD. Ces données récentes sur la persistance du virus dans des cardiomyopathies chroniques secondaires à des myocardites à EV-B suggèrent que ces délétions en région 5'NC dans la structure secondaire du domaine I (en feuille de trèfle, CL : *cloverleaf*) de l'ARN viral pourraient apparaître dès les phases précoces de l'infection. Ces formes virales majoritaires à ARN tronquées pourraient moduler les mécanismes de reconnaissance par les récepteurs de l'immunité (RLRs) induisant une diminution de l'activation de la voie des IFN de type I et au final une modulation des mécanismes inflammatoires mis en jeu dans la clairance virale. Les interférons de type I sont des facteurs clés de la réponse immunitaire antivirale et sont inhibés ou détournés par de nombreux virus<sup>315</sup>. L'activation des voies de signalisation de l'interféron de type I (IFN) est nécessaire pour induire une réponse immunitaire innée contre les infections humaines par les entérovirus du groupe B (EV-B)<sup>312</sup>. A ce jour, la dynamique de l'émergence des différentes populations d'EV-B tronquées en région 5'NC et leur impact sur la réponse IFN de type I au cours de la phase de myocardite aiguë chez l'homme sont inconnus.

Des populations d'EV-B tronquées jusqu'à 50 nucléotides ont été identifiées comme étant des formes majoritaires de persistance virale dans les tissus cardiaques de patients atteints de CMD<sup>316</sup>. Il nous a semblé pertinent de préciser les proportions de ces populations virales tronquées dès le stade précoce de myocardite chez l'Homme<sup>302</sup>. Dans la première partie de notre travail (**Manuscrit 1: Glenet et al, 2020, Scientific Reports**), les données moléculaires obtenues par notre approche de RACE-PCR confirme l'apparition précoce d'EV-B tronqués dans des prélèvements cardiaques et sanguins de patients pédiatriques atteints de myocardite aiguë. Les délétions génomiques entre 37 et 50 nucléotides en région 5'NC représentent une population d'EV-B statistiquement prédominante sur la seconde population virale présentant des délétions de 15 et 36 nucléotides. Ces résultats confirment notre hypothèse sur l'existence de mécanismes de sélection moléculaire précoce des formes d'EV-B tronqués en région 5'NC entre 15 et 50 nucléotides au cours de la

phase de réplication virale aiguë. Dans ces mêmes prélèvements, nous avons observé que les formes d'EV tronquées de 15 à 36 nucléotides induisent une réponse IFN de type I plus importante que les formes avec des délétions de 37 à 50 nucléotides. Ces résultats suggèrent que différentes formes tronquées en région 5'NC pourraient moduler l'activation de la réponse IFN de type I et donc la réponse inflammatoire locale liée au score de lésions cardiaques et de sévérité clinique <sup>315,317</sup>. Ceci a été démontré dans des modèles expérimentaux utilisant d'autres virus à ARN comme les virus influenza A et le virus de la Chorioméningite lymphocytaire <sup>318,319</sup>.

Dans un modèle d'infection systémique à CVB3 chez la souris immunocompétente DBA/2J, nous avons confirmé la dynamique précoce d'apparition des formes tronquées en région 5'NC et leur impact sur la réponse inflammatoire et en particulier la production des IFN de type I dans les tissus cibles (**Manuscrit 2 : Callon et al, en préparation**). Des proportions persistantes de populations virales tronquées en 5'NC seules ou associées à des formes virales complètes minoritaires ont été détectées dans des organes cibles présentant des lésions histologiques. Nos résultats montrent que les formes virales d'EV-B tronquées en région 5'NC peuvent moduler différemment les niveaux d'IFN- $\beta$  dans les organes cibles. L'émergence précoce de populations majoritaires d'EV-B tronquées en région 5'NC régule négativement l'activité de réplication génomique virale et les niveaux d'IFN de type I dans les phases précoces de l'infection des cellules cibles. En effet, les formes minoritaires d'EV-B complets ou tronqués en 5'NC de 8 à 36 nucléotides pourraient jouer le rôle de virus « helper » en fournissant, par des événements de recombinaison génomique, les éléments nécessaires à la réplication des formes ARN EV-B tronquées en 5'NC de 37 à 50 nucléotides <sup>47,48</sup>. Ces populations minoritaires tronquées de 8 à 36 nucléotides tendent à disparaître au cours de l'infection pour laisser place uniquement à des populations d'EV-B tronquées de 37-50 nt qui possèdent un avantage répliatif. Ces formes virales associées aux formes minoritaires tronquées de 8 à 36 nucléotides ou complète pourraient reproduire *in vivo* un mode de réplication virale qui a été observé en culture cellulaire pour des particules interférentes défectueuses (DI) <sup>263,318,319</sup>. L'accumulation des formes double brins et de l'ARN de polarité négative (Ratio ARN (+)/(-) et ration ARN double brin/simple brin < 5) au stade chronique de l'infection pourrait s'expliquer par une diminution de la synthèse de brin positif d'ARN viral à partir de brin négatif porteur de délétions en région 3'NC empêchant la liaison

de certains facteurs de réplication cellulaires tel que les RNP (*Nuclear ribonucleoproteins*)<sup>320</sup>. De façon intéressante nous avons identifié que les formes virales d'EV-B complètes et tronquées de 8 à 36 nucléotides en région 5'NC induisent d'important niveaux de production d'IFN- $\beta$  tandis que les formes d'EV-B tronquées de 37 à 50 nucléotides en région 5'NC régulent négativement la production d'IFN de type I. Les formes tronquées en région 5'NC étant la population majoritaire dans tous les organes cibles, ceci suggère que les formes virales avec des motifs secondaires modifiés dans leur région 5'NC pourraient échapper à la réponse immunitaire médiée par les IFN de type I et persister dans les organes cibles, comme rapporté dans la littérature pour d'autres virus à ARN de polarité positive (alphavirus, virus de l'hépatite C)<sup>321,322</sup>. Ceci pourrait s'expliquer par une différence qualitative de liaison entre les senseurs immunitaires innés cytoplasmiques (RIG-I ou MDA5) et les séquences immunomodulatrices de la région 5'NC des EV-B.

Afin de mieux comprendre le lien entre la structure du domaine I de l'ARN et l'induction de la voie des interférons de type I (IFN- $\beta$ ), la transfection d'ARN synthétiques de CVB3/28 présentant des délétions séquentielles de l'ARN génomique à l'extrémité 5'NC a été réalisée dans des lignées immortalisées (HeLa229), puis dans des cardiomyocytes primaires humains (HCM) cultivés (**Manuscrits 2 & 3, travaux originaux**) (**Annexe**). Cette approche *in vitro* a montré que le domaine I de l'ARN génomique EV-B (Cloverleaf (CL)) possédait des éléments structuraux secondaires immunomodulateurs essentiels responsables de l'induction de la voie IFN- $\beta$  dans les cellules cibles humaines. Après transfection dans des cardiomyocytes en culture d'ARN synthétiques correspondant aux formes tronquées mises en évidence chez l'Homme, nos résultats démontrent que la structure "d" du domaine I de l'ARN d'EV-B possède un motif immunomodulateur de cinq nucléotides qui est apparu dans notre modèle cellulaire comme responsable de l'induction de la voie des IFN- $\beta$ . Il a été démontré que les formes d'EV complet ou présentant des délétions intermédiaires de 15 à 36 nucléotides et préservant la tige boucle « d » induisaient une réponse IFN- $\beta$  significativement plus importante que les formes d'EV tronquées jusqu'à 50 nucléotides. Ces données suggèrent que ces formes d'EV tronquées de 15 à 36 nucléotides pourraient être un biomarqueur de sévérité de la myocardite avec pour principales limites que la virémie à EV-B est brève notamment chez les patients adultes<sup>78</sup>. Réciproquement, les formes d'EV présentant des délétions de 37 à 50

nucléotides induisent une moindre réponse IFN- $\beta$ . Ces résultats renforcent l'hypothèse que les formes d'EV tronquées de 37 à 50 nucléotides avec une perte de la tige boucle « d » seraient les formes majoritaires de persistance virale capables d'échapper au système immunitaire via une moindre capacité de réplication génomique virales et une modulation de la reconnaissance par MDA5 ou RIG-I et au final une diminution de la voie d'activation des IFN de type I. Ainsi les formes tronquées d'EV-B de 37 à 50 nucléotides se comporteraient bien comme des génomes viraux défectifs (DVG), comme décrits pour de nombreux virus à ARN <sup>323–326</sup>. Ils pourraient influencer la réponse immunitaire innée, notamment les niveaux d'activation de la voie des interférons de type I et l'évolution clinique de l'infection cardiaque aiguë vers la myocardite chronique et la CMD ou vers une forme de myocardite fulminante. L'intérêt de ces formes tronquées de 37 à 50 nucléotides comme biomarqueur périphérique de non-sévérité reste à étudier au travers de modèles animaux, puis dans des études cliniques multicentriques ciblant des populations de patients adultes.

Afin d'explorer les mécanismes moléculaires de reconnaissance par les senseurs de l'immunité des différentes formes d'ARN virales tronquées, nous avons utilisé des cellules STING-37 knockdown pour chaque RLR (RIG-I, MDA5 ou LGP2) (**Manuscrit 3, « Draft » en préparation**). Dans ce modèle expérimental nous avons montré que la détection des formes d'ARN tronquées en région 5'NC qui sont caractérisées par la perte d'un motif nucléotidique ARN dans la tige boucle « d » était dépendante de RIG-I et associée à un rétrocontrôle négatif de LGP2, ce qui entraîne une diminution de la réponse IFN- $\beta$  dans les cellules infectées. En revanche, la détection par les senseurs de l'immunité innée des formes complètes ou tronquées en région 5'NC mais présentant une structure tige-boucle "d" conservée était dépendante de MDA5 et associée à des niveaux plus élevés d'IFN- $\beta$ .

Les génomes viraux défectueux (DVGs) de nombreux virus à ARN tels que le virus de la stomatite vésiculeuse, le virus Sindbis et le virus Sendai sont connus pour être de puissants inducteurs d'IFN et sont aujourd'hui considérés comme les principaux stimulants de l'immunité antivirale dans de nombreuses infections <sup>294,324,327–331</sup>. Les DVGs sont reconnus par des récepteurs de type RIG-I (RLR : RIG-I, MDA5 et LGP2) qui activent la réponse immunitaire innée et façonnent la réponse immunitaire adaptative. Ces formes virales réduisent la virulence in vivo <sup>290,332</sup>, induisent des niveaux élevés d'interféron (IFN) lors d'infections in vitro <sup>327,333</sup>, et favorisent la

persistance virale in vitro et in vivo <sup>334</sup>. Les récepteurs RIG-I et MDA5 reconnaissent différentes familles de virus et induisent des niveaux d'IFN de type I variables en réponse aux agents pathogènes viraux <sup>335</sup>. RIG-I reconnaît avec une plus grande affinité les virus à ARN à brin négatif tels que les virus influenza <sup>152,336</sup>, les bunyavirus <sup>337,338</sup> et les rhabdovirus <sup>152,339</sup> ainsi que le virus de l'encéphalite japonaise à brin positif <sup>152</sup>, tandis que le récepteur MDA5 est activé lors de l'infection par des picornavirus à brin positif <sup>152,340,341</sup> et des artérovirus <sup>342,343</sup> ainsi que par le virus de l'hépatite D <sup>344,345</sup> et l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV) <sup>345</sup>. Une meilleure compréhension du mécanisme de reconnaissance des formes tronquées ou DVGS de virus à ARN par les RLRs et d'induction de la voie de signalisation des IFN de type I contribuerait alors au développement de vaccins et de thérapies antivirales pour de nombreuses maladies.

Certaines modifications des ARN viraux apparaissent aujourd'hui fondamentales pour la régulation de la réplication génomique virale des virus ZIKA ou de la Dengue et d'autres virus humains <sup>346-349</sup>. Outre les modifications de l'ARN viral par délétions ou mutations génomiques, les mécanismes d'action d'enzymes modifiant les acides nucléiques de façon post-transcriptionnelle (méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation) et leurs rôles dans l'infection et la propagation des virus sont actuellement peu étudiés. Ces modifications « épitranscriptomiques » des ARN génomiques pourraient moduler la reconnaissance des génomes viraux par les RLRs et l'induction de la voie des interférons de type I dans la cellule cible, favorisant ainsi l'échappement du virus à la réponse immunitaire innée et ainsi le développement d'infections aiguës ou persistantes dans les tissus cibles. Dans un projet régional collaboratif porté par le Dr. Yuri MOTORIN (Université de Lorraine/ CNRS DR10 Alsace) notre groupe va étudier l'impact de l'épitranscriptome des formes complètes et tronquées des ARN des EV-B et leurs niveaux de reconnaissance de ces formes modifiées par le système immunitaire inné de l'hôte (RLRs; RIG-I et MDA5). Ces travaux seront réalisés au cours des phases précoces de l'infection dans des lignées de cellules humaines dont des cardiomyocytes primaires en culture.

## **CONCLUSION GENERALE**

L'ensemble de nos travaux réalisés au cours de ce travail de thèse apportent de nouvelles données concernant les mécanismes moléculaires de reconnaissance des formes ARN virales tronquées des EV-B générées naturellement au cours de la phase aiguë de l'infection virale dans les tissus cibles. Ils indiquent comment la génération naturelle de formes ARN virales tronquées en région 5'NC peut moduler les mécanismes de reconnaissance de l'ARN viral par les senseurs (RLRs) de l'immunité et permettre au virus de diminuer les niveaux de la réponse IFN de type I.

Ces mécanismes de régulation de la voie de production des INF de type I par des populations virales tronquées moduleraient localement les niveaux de réponse inflammatoire favorisant la persistance des formes tronquées dans les tissus infectés. La persistance des formes ARN virales tronquées pourrait expliquer au niveau immuno-virologique l'évolution de la myocardite aiguë vers la phase chronique de cette pathologie au cours des infections humaines par les EV-B.

Au final nos résultats apportent un nouveau socle de connaissances qui permettront le développement de nouvelles stratégie d'immunothérapie ciblée visant à rétablir une réponse immunitaire innée antivirale par une restauration de l'activation de la voie des interférons de type I et autoriser ainsi une clairance virale des tissus dans les infections humaines par les EV-B.

# **PERSPECTIVES**

La détection quantitative de formes ARN d'EV-B tronquées en région 5' NC de 15 à 36 nucléotides (formes tronquées intermédiaires) par RACE-PCR dans des cas de myocardites suggère que ces formes d'EV tronquées détectable dans le sang périphérique pourraient être un biomarqueur de sévérité de la myocardite. En effet les proportions de ces formes ARN virales ont été identifiées comme corrélées positivement aux niveaux des interférons de type I dans le sang et les tissus cardiaques humains. Un tel marqueur viral périphérique sanguin semblerait plus pertinent que des biomarqueurs cellulaires liés à l'infection à EV-B qui sont trop complexes à isoler à partir des modèles expérimentaux<sup>350</sup> ou non spécifiques comme la C Réactive Protéine ultrasensible<sup>351-354</sup> ou d'autres marqueurs inflammatoires indirects et déjà décrits dans la littérature.

Les délétions naturelles de nucléotides affectant le domaine I de la région 5'NC du génome EV-B et entraînent une modulation de la détection immunitaire de l'ARN viral par les RLRs. À ce jour, l'interaction entre les RLRs et les formes d'ARN tronquées en région 5'NC reste inconnue et des études complémentaires sont en cours de réalisation (Collaboration du laboratoire Cardiovir EA-4684 avec l'Institut Pasteur Paris) afin de prédire informatiquement puis d'identifier biologiquement les structures ARN reconnues par chacun des trois RLRs (RIG-I, MDA5 et LGP2) au cours des phases précoces de l'infection par les EV-B dans la cellule cible humaine. Ainsi, des lignées cellulaires humaines HEK293 exprimant de manière stable les protéines, RIG-I ou MDA5, ou LGP2 marquées One-STrEP ont été générées pour permettre la purification des ribonucléoprotéines (RNP) et des complexes protéiques<sup>186,341,355,356</sup>. L'utilisation de cette technique de purification par chromatographie d'affinité One-STrEP-RLRs permettra d'identifier les motifs génomiques des ARN d'EV tronqués en région 5'NC spécifiquement reconnus par RIG-I, MDA5 et LGP2.

Les résultats de ces futurs programmes scientifiques devraient stimuler le développement d'immunothérapies ciblées visant à moduler les réponses inflammatoires délétères dans les myocardites aiguës ou bien au contraire à favoriser la clairance virale dans les cardiomyopathies chroniques. La restauration d'une réponse immunitaire innée antivirale efficace ciblant la voie de signalisation des RLRs et l'activation de la voie des interférons de type I pourrait permettre un contrôle thérapeutique des infections virales humaines à EV-B. Ces futures stratégies autoriseront une meilleure prise en charge thérapeutique des patients souffrant de

pathologies aiguës et chroniques induites par ces agents viraux très communs en médecine humaine.

## REFERENCES

1. ICTV Virus Taxonomy 2014. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
2. Palacios, G. & Oberste, M. S. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol.* **11**, 424–433 (2005).
3. Andréoletti, L. Entérovirus. *EMC - Mal. Infect.* **7**, 1–15 (2010).
4. Du, H. *et al.* Enterovirus 71 2C Protein Inhibits NF- $\kappa$ B Activation by Binding to RelA(p65). *Sci. Rep.* **5**, (2015).
5. Zheng, Z. *et al.* Enterovirus 71 2C protein inhibits TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B by suppressing I $\kappa$ B kinase  $\beta$  phosphorylation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 2202–2212 (2011).
6. Mukherjee, A. *et al.* The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog.* **7**, e1001311 (2011).
7. Oldstone, M. B. A. Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology* **344**, 111–118 (2006).
8. Kembball, C. C. *et al.* Coxsackievirus B3 inhibits antigen presentation in vivo, exerting a profound and selective effect on the MHC class I pathway. *PLoS Pathog.* **5**, e1000618 (2009).
9. Renois, F., Bouin, A., Wehbe, M., Leveque, N. & Andreoletti, L. Infections persistantes à entérovirus et pathologies humaines. *Virologie* **18**, 306–324 (2014).
10. Chapman, N. M., Kim, K.-S., Drescher, K. M., Oka, K. & Tracy, S. 5' terminal deletions in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. *Virology* **375**, 480 (2008).
11. Bouin, A. *et al.* Major Persistent 5' Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in Human Endomyocardial Tissues. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, (2016).

12. Bouin, A. *et al.* Enterovirus Persistence in Cardiac Cells of Patients Suffering From Idiopathic Dilated Cardiomyopathy is Linked to 5' Terminal Genomic RNA-Deleted Viral Populations With Viral-Encoded Proteinase Activities. *Circulation* (2019) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035966.
13. Lévêque, N. *et al.* Functional Consequences of RNA 5'-Terminal Deletions on Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *J. Virol.* **91**, (2017).
14. Feng, Q. *et al.* MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep.* **2**, 1187–1196 (2012).
15. Feng, Q. *et al.* Coxsackievirus cloverleaf RNA containing a 5' triphosphate triggers an antiviral response via RIG-I activation. *PLoS One* **9**, e95927 (2014).
16. Sanchez David, R. Y. *et al.* Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors. *eLife* **5**, e11275 (2016).
17. Zell, R. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2421–2422 (2017).
18. Zell, R. Picornaviridae-the ever-growing virus family. *Arch. Virol.* **163**, 299–317 (2018).
19. Palacios, G. & Oberste, M. S. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol.* **11**, 424–433 (2005).
20. Le Gall, O. *et al.* Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Arch. Virol.* **153**, 715–727 (2008).
21. Lulla, V. *et al.* An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells. *Nat. Microbiol.* **4**, 280–292 (2019).
22. Holm-Hansen, C. C., Midgley, S. E., Schjørring, S. & Fischer, T. K. The importance of enterovirus surveillance in a Post-polio world. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 352–354 (2017).

23. Basnet, S., Palmenberg, A. C. & Gern, J. E. Rhinoviruses and Their Receptors. *Chest* **155**, 1018–1025 (2019).
24. Bochkov, Y. A. & Gern, J. E. Rhinoviruses and Their Receptors: Implications for Allergic Disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **16**, 30 (2016).
25. Lukashev, A. N., Vakulenko, Y. A., Turbabina, N. A., Deviatkin, A. A. & Drexler, J. F. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? *Rev. Med. Virol.* **28**, e2002 (2018).
26. Lukashev, A. N. *et al.* Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* **77**, 10423–10431 (2003).
27. Peigue-Lafeuille, H., Mirand, A., Archimbaud, C., Bailly, J.-L. & Henquell, C. Émergence et réémergence chez les entérovirus : de la poliomyélite à la maladie pieds-mains-bouche. *Virologie* **18**, 87–104 (2014).
28. Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V., Amoutzias, G. D. & Markoulatos, P. Recombination among human non-polio enteroviruses: implications for epidemiology and evolution. *Virus Genes* **50**, 177–188 (2015).
29. Combelas, N., Holmblat, B., Joffret, M.-L., Colbère-Garapin, F. & Delpeyroux, F. Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses* **3**, 1460–1484 (2011).
30. Volle, R. *et al.* High Permissiveness for Genetic Exchanges between Enteroviruses of Species A, including Enterovirus 71, Favors Evolution through Intertypic Recombination in Madagascar. *J. Virol.* **93**, (2019).
31. Ks, B. *et al.* Increase in ECHOvirus 6 infections associated with neurological symptoms in the Netherlands, June to August 2016. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **21**, (2016).

32. Baggen, J., Thibaut, H. J., Strating, J. R. P. M. & Kuppeveld, F. J. M. van. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 368–381 (2018).
33. Solomon, T. *et al.* Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 778–790 (2010).
34. Jiang, P., Liu, Y., Ma, H.-C., Paul, A. V. & Wimmer, E. Picornavirus morphogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **78**, 418–437 (2014).
35. Racaniello, V. R. Picornaviridae : The viruses and Their Replication. in *Fields Virology* vol. 1 795–838 (Knipe & Howley, 2007).
36. Lin, J.-Y. *et al.* Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J. Biomed. Sci.* **16**, 103 (2009).
37. Rothberg, J. M. *et al.* An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* **475**, 348–352 (2011).
38. Ambros, V. & Baltimore, D. Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. *J. Biol. Chem.* **253**, 5263–5266 (1978).
39. Sun, Y., Guo, Y. & Lou, Z. Formation and working mechanism of the picornavirus VPg uridylylation complex. *Curr. Opin. Virol.* **9**, 24–30 (2014).
40. Paul, A. V. & Wimmer, E. Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Res.* **206**, 12–26 (2015).
41. Kitamura, N. *et al.* Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* **291**, 547–553 (1981).
42. Fernández-Miragall, O., López de Quinto, S. & Martínez-Salas, E. Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res.* **139**, 172–182 (2009).
43. Kempf, B. J. & Barton, D. J. Poliovirus 2APro Increases Viral mRNA and Polysome Stability Coordinately in Time with Cleavage of eIF4G. *J. Virol.* **82**, 5847–5859 (2008).

44. Kempf, B. J. & Barton, D. J. Poly(rC) binding proteins and the 5' cloverleaf of uncapped poliovirus mRNA function during de novo assembly of polysomes. *J. Virol.* **82**, 5835–5846 (2008).
45. Kauder, S. E. & Racaniello, V. R. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* **113**, 1743–1753 (2004).
46. Andino, R., Bøddeker, N., Silvera, D. & Gamarnik, A. V. Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol.* **7**, 76–82 (1999).
47. Serrano, P., Pulido, M. R., Sáiz, M. & Martínez-Salas, E. The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J. Gen. Virol.* **87**, 3013–3022 (2006).
48. Zoll, J., Heus, H. A., van Kuppeveld, F. J. M. & Melchers, W. J. G. The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Res.* **139**, 209–216 (2009).
49. Steil, B. P. & Barton, D. J. Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res.* **139**, 240–252 (2009).
50. Lévêque, N. *et al.* Echovirus 6 strains derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway. *Virus Res.* **130**, 1–9 (2007).
51. Ambros, V. & Baltimore, D. Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J. Biol. Chem.* **255**, 6739–6744 (1980).
52. Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Hellen, C. U. & Shatsky, I. N. Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J. Biol. Chem.* **273**, 18599–18604 (1998).
53. Belsham, G. J. & Sonenberg, N. Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends Microbiol.* **8**, 330–335 (2000).

54. Ansardi, D. C. & Morrow, C. D. Amino acid substitutions in the poliovirus maturation cleavage site affect assembly and result in accumulation of provirions. *J. Virol.* **69**, 1540–1547 (1995).
55. Wang, H., Xie, G.-C. & Duan, Z.-J. [Current research on picornavirus 3C protease]. *Bing Xue Bao Chin. J. Virol.* **30**, 579–586 (2014).
56. Hellen, C. U. & Wimmer, E. The role of proteolytic processing in the morphogenesis of virus particles. *Experientia* **48**, 201–215 (1992).
57. Eldin, P. *et al.* TRIM22 E3 ubiquitin ligase activity is required to mediate antiviral activity against encephalomyocarditis virus. *J. Gen. Virol.* **90**, 536–545 (2009).
58. Peersen, O. B. Picornaviral polymerase structure, function, and fidelity modulation. *Virus Res.* **234**, 4–20 (2017).
59. Effects of mutations in the VP2/VP4 cleavage site of Swine vesicular disease virus on RNA encapsidation and viral infectivity. - PubMed - NCBI.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14505087>.
60. Tang, W.-F. *et al.* Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *J. Biol. Chem.* **282**, 5888–5898 (2007).
61. Harris, K. S. *et al.* Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding. *J. Biol. Chem.* **269**, 27004–27014 (1994).
62. Parsley, T. B., Towner, J. S., Blyn, L. B., Ehrenfeld, E. & Semler, B. L. Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA N. Y. N* **3**, 1124–1134 (1997).
63. Basavappa, R. *et al.* Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **3**, 1651–1669 (1994).

64. Novak, J. E. & Kirkegaard, K. Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J. Virol.* **65**, 3384–3387 (1991).
65. Direct Interaction between Two Viral Proteins, the Nonstructural Protein 2CATPase and the Capsid Protein VP3, Is Required for Enterovirus Morphogenesis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2928791/>.
66. Bordería, A. V., Stapleford, K. A. & Vignuzzi, M. RNA virus population diversity: implications for inter-species transmission. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 643–648 (2011).
67. Lai, M. M. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* **56**, 61–79 (1992).
68. Andino, R. & Domingo, E. Viral quasispecies. *Virology* **479–480**, 46–51 (2015).
69. Bisseux, M. *et al.* Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **23**, (2018).
70. Oshiki, M. *et al.* Microfluidic PCR Amplification and MiSeq Amplicon Sequencing Techniques for High-Throughput Detection and Genotyping of Human Pathogenic RNA Viruses in Human Feces, Sewage, and Oysters. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
71. Andréoletti, L. *et al.* Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J. Med. Virol.* **61**, 341–346 (2000).
72. Rotbart, H. A. Viral meningitis. *Semin. Neurol.* **20**, 277–292 (2000).
73. Andréoletti, L., Renois, F., Jacques, J. & Lévêque, N. Human Enteroviruses and Respiratory Infections. *Med. Sci. Paris* 921–30 (2009).

74. Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S. & Pallansch, M. A. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ. Wash. DC 2002* **55**, 1–20 (2006).
75. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? - Lukashov - 2018 - Reviews in Medical Virology - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rmv.2002>.
76. Point sur les infection 06/2019. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-prevention-vaccinale/poliomyelite/documents/bulletin-national/point-sur-les-infections-a-enterovirus-au-16-octobre-2018>.
77. Impact of Enterovirus Molecular Assay Turnaround Time on Hospitalization Length During an Echovirus 30 Meningitis Outbreak, France, Fall 2014 ~ Fulltext. <https://benthamopen.com/FULLTEXT/TOVJ-13-1>.
78. Cheng, H.-Y. *et al.* The correlation between the presence of viremia and clinical severity in patients with enterovirus 71 infection: a multi-center cohort study. *BMC Infect. Dis.* **14**, 417 (2014).
79. Julien, J. *et al.* Postpolio syndrome: poliovirus persistence is involved in the pathogenesis. *J. Neurol.* **246**, 472–476 (1999).
80. Leparç-Goffart, I. *et al.* Evidence of presence of poliovirus genomic sequences in cerebrospinal fluid from patients with postpolio syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2023–2026 (1996).
81. Vandenberghe, N. *et al.* Cerebrospinal fluid detection of enterovirus genome in ALS: a study of 242 patients and 354 controls. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* **11**, 277–282 (2010).

82. Chia, J., Chia, A., Voeller, M., Lee, T. & Chang, R. Acute enterovirus infection followed by myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) and viral persistence. *J. Clin. Pathol.* **63**, 165–168 (2010).
83. Kerr, J. R. Enterovirus infection of the stomach in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *J. Clin. Pathol.* **61**, 1–2 (2008).
84. Dennert, R., Crijns, H. J. & Heymans, S. Acute viral myocarditis. *Eur. Heart J.* **29**, 2073–2082 (2008).
85. Cooper, L. T., Jr. Myocarditis. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1526–1538 (2009).
86. Kühn, U. *et al.* High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with ‘idiopathic’ left ventricular dysfunction. *Circulation* **111**, 887–893 (2005).
87. Maron, B. J. *et al.* Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* **113**, 1807–1816 (2006).
88. Tsutamoto, T. *et al.* Relationship between tumor necrosis factor- $\alpha$  production and oxidative stress in the failing hearts of patients with dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**, 2086–2092 (2001).
89. Weintraub, R. G., Semsarian, C. & Macdonald, P. Dilated cardiomyopathy. *The Lancet* **390**, 400–414 (2017).
90. Aretz, H. T. *et al.* Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* **1**, 3–14 (1987).

91. Baughman, K. L. Diagnosis of Myocarditis: Death of Dallas Criteria. *Circulation* **113**, 593–595 (2006).
92. Kindermann, I. *et al.* Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* **118**, 639–648 (2008).
93. Caforio, A. L. P. *et al.* Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* **34**, 2636–2648, 2648a–2648d (2013).
94. Biesbroek, P. S., Beek, A. M., Germans, T., Niessen, H. W. M. & van Rossum, A. C. Diagnosis of myocarditis: Current state and future perspectives. *Int. J. Cardiol.* **191**, 211–219 (2015).
95. Lurz, P. *et al.* Diagnostic performance of CMR imaging compared with EMB in patients with suspected myocarditis. *JACC Cardiovasc. Imaging* **5**, 513–524 (2012).
96. Bowles, N. E. *et al.* Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**, 466–472 (2003).
97. Bock, C.-T., Klingel, K. & Kandolf, R. Human parvovirus B19-associated myocarditis. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1248–1249 (2010).
98. McKenna, W. J., Maron, B. J. & Thiene, G. Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circ. Res.* **121**, 722–730 (2017).
99. Ponikowski, P. *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* **37**, 2129–2200 (2016).

100. Luk, A., Ahn, E., Soor, G. S. & Butany, J. Dilated cardiomyopathy: a review. *J. Clin. Pathol.* **62**, 219–225 (2009).
101. Felker, G. M. *et al.* Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1077–1084 (2000).
102. Köhl, U., Lassner, D., von Schlippenbach, J., Poller, W. & Schultheiss, H.-P. Interferon-Beta improves survival in enterovirus-associated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1295–1296 (2012).
103. Trachtenberg, B. H. & Hare, J. M. Inflammatory Cardiomyopathic Syndromes. *Circ. Res.* **121**, 803–818 (2017).
104. Andreoletti, L. *et al.* Detection of enterovirus-specific RNA sequences in explanted myocardium biopsy specimens from patients with dilated or ischemic cardiomyopathy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **21**, 1315–1317 (1995).
105. Baboonian, C., Davies, M. J., Booth, J. C. & McKenna, W. J. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **223**, 31–52 (1997).
106. Kim, K.-S. *et al.* 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J. Virol.* **79**, 7024–7041 (2005).
107. Tam, P. E. Coxsackievirus myocarditis: interplay between virus and host in the pathogenesis of heart disease. *Viral Immunol.* **19**, 133–146 (2006).
108. Andréoletti, L. *et al.* Experimental CVB3-induced chronic myocarditis in two murine strains: Evidence of interrelationships between virus replication and myocardial damage in persistent cardiac infection. *J. Med. Virol.* **52**, 206–214 (1997).
109. Yajima, T. & Knowlton, K. U. Viral Myocarditis: From the Perspective of the Virus. *Circulation* **119**, 2615–2624 (2009).

110. Noutsias, M. *et al.* Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* **104**, 275–280 (2001).
111. Garmaroudi, F. S. *et al.* Coxsackievirus B3 replication and pathogenesis. *Future Microbiol.* **10**, 629–653 (2015).
112. Kawai, C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* **99**, 1091–1100 (1999).
113. Matsumori, A., Yamada, T., Suzuki, H., Matoba, Y. & Sasayama, S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br. Heart J.* **72**, 561–566 (1994).
114. Corrado, D. & Thiene, G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies. *Circulation* **113**, 1634–1637 (2006).
115. Feldman, A. M. *et al.* The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 537–544 (2000).
116. Ciháková, D., Sharma, R. B., Fairweather, D., Afanasyeva, M. & Rose, N. R. Animal models for autoimmune myocarditis and autoimmune thyroiditis. *Methods Mol. Med.* **102**, 175–193 (2004).
117. Rose, N. R. *et al.* Cardiac myosin and autoimmune myocarditis. *Ciba Found. Symp.* **129**, 3–24 (1987).
118. Flynn, C. T., Kimura, T., Frimpong-Boateng, K., Harkins, S. & Whitton, J. L. Immunological and pathological consequences of coxsackievirus RNA persistence in the heart. *Virology* **512**, 104–112 (2017).

119. Badorff, C. *et al.* Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat. Med.* **5**, 320–326 (1999).
120. Xiong, D. *et al.* Inducible cardiac-restricted expression of enteroviral protease 2A is sufficient to induce dilated cardiomyopathy. *Circulation* **115**, 94–102 (2007).
121. Mammette, A. *Virologie Médicale*. (2002).
122. Racaniello, V. R. Picornaviridae: the viruses and their replication. in *Knipe DM and Howley PM (ed), Fields Virology* vol. 1 795–838 (Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, 2007).
123. Andréoletti, L., Lévêque, N., Boulagnon, C., Brasselet, C. & Fornes, P. Viral causes of human myocarditis. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **102**, 559–568 (2009).
124. Genoni, A. *et al.* Revealing enterovirus infection in chronic human disorders: An integrated diagnostic approach. *Sci. Rep.* **7**, 5013 (2017).
125. Dotta, F. *et al.* Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5115–5120 (2007).
126. Tracy, S., Drescher, K. M. & Chapman, N. M. Enteroviruses and type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **27**, 820–823 (2011).
127. Bouin, A. *et al.* Enterovirus Persistence in Cardiac Cells of Patients Suffering From Idiopathic Dilated Cardiomyopathy is Linked to 5' Terminal Genomic RNA-Deleted Viral Populations With Viral-Encoded Proteinase Activities. *Circulation* (2019) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035966.
128. Nicholls, A. C. & Thomas, M. Coxsackie virus infection in acute myocardial infarction. *Lancet* **1**, 883–884 (1977).

129. Henke, A., Jarasch, N. & Wutzler, P. Coxsackievirus B3 vaccines: use as an expression vector for prevention of myocarditis. *Expert Rev. Vaccines* **7**, 1557–1567 (2008).
130. Andréoletti, L., Renois, F., Jacques, J. & Lévêque, N. Entérovirus non poliomyélitiques et pathologies respiratoires. *médecine/sciences* **25**, 921–930 (2009).
131. Wessels, E. *et al.* Effects of picornavirus 3A Proteins on Protein Transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J. Virol.* **80**, 11852–11860 (2006).
132. Meylan, E., Tschopp, J. & Karin, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39–44 (2006).
133. Sansonetti, P. J. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat. Immunol.* **7**, 1237–1242 (2006).
134. Anders, H.-J. & Schlöndorff, D. Toll-like receptors: emerging concepts in kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **16**, 177–183 (2007).
135. Jensen, S. & Thomsen, A. R. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J. Virol.* **86**, 2900–2910 (2012).
136. O’Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–460 (2013).
137. Kawamura, T., Ogawa, Y., Aoki, R. & Shimada, S. Innate and intrinsic antiviral immunity in skin. *J. Dermatol. Sci.* **75**, 159–166 (2014).
138. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
139. Casanova, J.-L., Abel, L. & Quintana-Murci, L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 447–491 (2011).

140. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
141. Abe, Y. *et al.* The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* **86**, 185–194 (2012).
142. Negishi, H. *et al.* A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20446–20451 (2008).
143. Wang, C. *et al.* Differential Regulation of TLR Signaling on the Induction of Antiviral Interferons in Human Intestinal Epithelial Cells Infected with Enterovirus 71. *PLoS ONE* **11**, (2016).
144. Satoh, M. *et al.* Expression of Toll-like receptor 4 is associated with enteroviral replication in human myocarditis. *Clin. Sci.* **104**, 577–584 (2003).
145. Satoh, M. *et al.* Toll-like receptor 4 is expressed with enteroviral replication in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **84**, 173–181 (2004).
146. Xu, J., Yang, Y., Wang, C. & Jiang, B. Rotavirus and coxsackievirus infection activated different profiles of toll-like receptors and chemokines in intestinal epithelial cells. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **58**, 585–592 (2009).
147. Oviedo-Boyso, J., Bravo-Patiño, A. & Baizabal-Aguirre, V. M. Collaborative Action of Toll-Like and Nod-Like Receptors as Modulators of the Inflammatory Response to Pathogenic Bacteria. *Mediators of Inflammation*  
<https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/432785/> (2014)  
doi:<https://doi.org/10.1155/2014/432785>.

148. Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997–1001 (2006).
149. Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994–997 (2006).
150. Plumet, S. *et al.* Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PloS One* **2**, e279 (2007).
151. Kang, D. *et al.* mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 637–642 (2002).
152. Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101–105 (2006).
153. Yoneyama, M. *et al.* Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 2851–2858 (2005).
154. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**, 730–737 (2004).
155. Gitlin, L. *et al.* Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8459–8464 (2006).
156. Loo, Y.-M. *et al.* Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J. Virol.* **82**, 335–345 (2008).
157. Maelfait, J. & Beyaert, R. Emerging role of ubiquitination in antiviral RIG-I signaling. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **76**, 33–45 (2012).
158. Wies, E. *et al.* Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* **38**, 437–449 (2013).

159. Saito, T. *et al.* Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 582–587 (2007).
160. Kowalinski, E. *et al.* Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* **147**, 423–435 (2011).
161. Jiang, F. *et al.* Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature* **479**, 423–427 (2011).
162. Luo, D. *et al.* Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell* **147**, 409–422 (2011).
163. Cui, S. *et al.* The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol. Cell* **29**, 169–179 (2008).
164. Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**, 981–988 (2005).
165. Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172 (2005).
166. Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z. J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669–682 (2005).
167. Wang, T.-C. & Chao, M. RNA recombination of hepatitis delta virus in natural mixed-genotype infection and transfected cultured cells. *J. Virol.* **79**, 2221–2229 (2005).
168. Takahashi, K. *et al.* Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol. Cell* **29**, 428–440 (2008).
169. Yoneyama, M., Onomoto, K. & Fujita, T. Cytoplasmic recognition of RNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 841–846 (2008).
170. Yoneyama, M. & Fujita, T. Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity* **29**, 178–181 (2008).

171. Wu, W. *et al.* RIG-I and TLR3 are both required for maximum interferon induction by influenza virus in human lung alveolar epithelial cells. *Virology* **482**, 181–188 (2015).
172. Rawling, D. C., Fitzgerald, M. E. & Pyle, A. M. Establishing the role of ATP for the function of the RIG-I innate immune sensor. *eLife* **4**, (2015).
173. Xu, L.-G. *et al.* VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN- $\beta$  Signaling. *Mol. Cell* **19**, 727–740 (2005).
174. Takeuchi, O. & Akira, S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 17–22 (2008).
175. Wang, J. P. *et al.* MDA5 and MAVS mediate type I interferon responses to coxsackie B virus. *J. Virol.* **84**, 254–260 (2010).
176. Schmidt, A. *et al.* 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12067–12072 (2009).
177. Yoneyama, M. & Fujita, T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol. Rev.* **227**, 54–65 (2009).
178. Saito, T. & Gale, M. [RIG-I mediated hepatic innate immune signaling that controls HCV infection]. *Uirusu* **58**, 105–115 (2008).
179. Gondai, T., Yamaguchi, K., Miyano-Kurosaki, N., Habu, Y. & Takaku, H. Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon. *Nucleic Acids Res.* **36**, e18 (2008).
180. Barral, P. M., Sarkar, D., Fisher, P. B. & Racaniello, V. R. RIG-I is cleaved during picornavirus infection. *Virology* **391**, 171–176 (2009).
181. Barral, P. M. *et al.* MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* **81**, 3677–3684 (2007).

182. Kato, M. *et al.* Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* **22**, e87-94 (2011).
183. Kovacsovics, M. *et al.* Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr. Biol. CB* **12**, 838–843 (2002).
184. Berke, I. C. & Modis, Y. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA. *EMBO J.* **31**, 1714–1726 (2012).
185. Peisley, A. *et al.* Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 21010–21015 (2011).
186. Pichlmair, A. *et al.* Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J. Virol.* **83**, 10761–10769 (2009).
187. Kato, H. *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* **205**, 1601–1610 (2008).
188. Dias Junior, A. G., Sampaio, N. G. & Rehwinkel, J. A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation. *Trends Microbiol.* **27**, 75–85 (2019).
189. Dixit, E. *et al.* Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* **141**, 668–681 (2010).
190. Baril, M., Racine, M.-E., Penin, F. & Lamarre, D. MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease. *J. Virol.* **83**, 1299–1311 (2009).
191. Sasaki, O. *et al.* A structural perspective of the MAVS-regulatory mechanism on the mitochondrial outer membrane using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 1017–1027 (2013).

192. Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–678 (2008).
193. Zhong, B. *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**, 538–550 (2008).
194. Sun, W. *et al.* ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8653–8658 (2009).
195. Jin, M. S. & Lee, J.-O. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* **29**, 182–191 (2008).
196. Ranjan, P. *et al.* Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. *Trends Mol. Med.* **15**, 359–368 (2009).
197. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **147**, 258–267 (1957).
198. Vilcek, J. Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity* **25**, 343–348 (2006).
199. Zhang, K. Overview of Interferon: Characteristics, signaling and anti-cancer effect. *Arch. Biotechnol. Biomed.* **1**, 001–016 (2017).
200. Taniguchi, T., Fujii-Kuriyama, Y. & Muramatsu, M. Molecular cloning of human interferon cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 4003–4006 (1980).
201. Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **202**, 8–32 (2004).
202. Farrar, M. A. & Schreiber, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 571–611 (1993).
203. Ank, N., West, H. & Paludan, S. R. IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **26**, 373–379 (2006).

204. Uzé, G. & Monneron, D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie* **89**, 729–734 (2007).
205. Marcello, T. *et al.* Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* **131**, 1887–1898 (2006).
206. Stanifer, M. L., Pervolaraki, K. & Boulant, S. Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
207. Liu, Y. *et al.* Enterovirus 71 inhibits cellular type I interferon signaling by downregulating JAK1 protein expression. *Viral Immunol.* **27**, 267–276 (2014).
208. Le Bon, A. & Tough, D. F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 432–436 (2002).
209. Crouse, J., Kalinke, U. & Oxenius, A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 231–242 (2015).
210. Zuniga, E. I., Macal, M., Lewis, G. M. & Harker, J. A. Innate and Adaptive Immune Regulation During Chronic Viral Infections. *Annu. Rev. Virol.* **2**, 573–597 (2015).
211. Feng, Q. *et al.* Coxsackievirus cloverleaf RNA containing a 5' triphosphate triggers an antiviral response via RIG-I activation. *PloS One* **9**, e95927 (2014).
212. Harris, K. G. & Coyne, C. B. Enter at your own risk: how enteroviruses navigate the dangerous world of pattern recognition receptor signaling. *Cytokine* **63**, 230–236 (2013).
213. Triantafilou, K. *et al.* Visualisation of direct interaction of MDA5 and the dsRNA replicative intermediate form of positive strand RNA viruses. *J. Cell Sci.* **125**, 4761–4769 (2012).
214. Satoh, T. *et al.* LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 1512–1517 (2010).

215. Flodström-Tullberg, M. *et al.* RNase L and double-stranded RNA-dependent protein kinase exert complementary roles in islet cell defense during coxsackievirus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 1171–1177 (2005).
216. Pallansch, M. A. & Roos, R. Enteroviruses : Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. in *Fields Virology* vol. 1 840–893 (Lippincott William & Wilkens Compagny, 2007).
217. Ida-Hosonuma, M. *et al.* The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J. Virol.* **79**, 4460–4469 (2005).
218. Althof, N. *et al.* In Vivo Ablation of Type I Interferon Receptor from Cardiomyocytes Delays Coxsackieviral Clearance and Accelerates Myocardial Disease. *J. Virol.* **88**, 5087–5099 (2014).
219. Lei, X. *et al.* The 3C Protein of Enterovirus 71 Inhibits Retinoid Acid-Inducible Gene I-Mediated Interferon Regulatory Factor 3 Activation and Type I Interferon Responses. *J. Virol.* **84**, 8051–8061 (2010).
220. Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Manoj Kumar, P. P. & Mantovani, A. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 563–566 (2000).
221. West, A. P., Koblansky, A. A. & Ghosh, S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 409–437 (2006).
222. Lei, X. *et al.* Cleavage of the Adaptor Protein TRIF by Enterovirus 71 3C Inhibits Antiviral Responses Mediated by Toll-Like Receptor 3. *J. Virol.* **85**, 8811–8818 (2011).
223. Lei, X. *et al.* Cleavage of interferon regulatory factor 7 by enterovirus 71 3C suppresses cellular responses. *J. Virol.* **87**, 1690–1698 (2013).
224. Cui, S. *et al.* Crystal structure of human enterovirus 71 3C protease. *J. Mol. Biol.* **408**, 449–461 (2011).

225. Lei, X. *et al.* Enterovirus 71 3C inhibits cytokine expression through cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 complex. *J. Virol.* **88**, 9830–9841 (2014).
226. Baeuerle, P. A. & Baichwal, V. R. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv. Immunol.* **65**, 111–137 (1997).
227. Zeytun, A., van Velkinburgh, J. C., Pardington, P. E., Cary, R. R. & Gupta, G. Pathogen-specific innate immune response. *Adv. Exp. Med. Biol.* **598**, 342–357 (2007).
228. Li, Q. *et al.* 2C Proteins of Enteroviruses Suppress IKK $\beta$  Phosphorylation by Recruiting Protein Phosphatase 1. *J. Virol.* **90**, 5141–5151 (2016).
229. Zheng, Z. *et al.* Enterovirus 71 2C protein inhibits TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B by suppressing I $\kappa$ B kinase  $\beta$  phosphorylation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**, 2202–2212 (2011).
230. Mukherjee, A. *et al.* The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog.* **7**, e1001311 (2011).
231. Hu, Y. *et al.* Different microRNA alterations contribute to diverse outcomes following EV71 and CA16 infections: Insights from high-throughput sequencing in rhesus monkey peripheral blood mononuclear cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **81**, 20–31 (2016).
232. Qu, L. *et al.* Disruption of TLR3 signaling due to cleavage of TRIF by the hepatitis A virus protease-polymerase processing intermediate, 3CD. *PLoS Pathog.* **7**, e1002169 (2011).
233. Ho, B.-C. *et al.* Inhibition of miR-146a prevents enterovirus-induced death by restoring the production of type I interferon. *Nat. Commun.* **5**, 3344 (2014).
234. Yoneyama, M., Onomoto, K., Jogi, M., Akaboshi, T. & Fujita, T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 48–53 (2015).

235. Feng, Q. *et al.* Enterovirus 2Apro targets MDA5 and MAVS in infected cells. *J. Virol.* **88**, 3369–3378 (2014).
236. McIntire, J. J. *et al.* Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature* **425**, 576 (2003).
237. Rebsamen, M., Meylan, E., Curran, J. & Tschopp, J. The antiviral adaptor proteins Cardif and Trif are processed and inactivated by caspases. *Cell Death Differ.* **15**, 1804–1811 (2008).
238. Cornell, C. T., Kiosses, W. B., Harkins, S. & Whitton, J. L. Inhibition of protein trafficking by coxsackievirus b3: multiple viral proteins target a single organelle. *J. Virol.* **80**, 6637–6647 (2006).
239. Lu, J. *et al.* Enterovirus 71 disrupts interferon signaling by reducing the level of interferon receptor 1. *J. Virol.* **86**, 3767–3776 (2012).
240. Hung, H.-C. *et al.* Synergistic inhibition of enterovirus 71 replication by interferon and rupintrivir. *J. Infect. Dis.* **203**, 1784–1790 (2011).
241. Fensterl, V. & Sen, G. C. Interferons and viral infections. *BioFactors Oxf. Engl.* **35**, 14–20 (2009).
242. Djeu, J. Y., Heinbaugh, J. A., Holden, H. T. & Herberman, R. B. Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **122**, 175–181 (1979).
243. Le Page, C., Génin, P., Baines, M. G. & Hiscott, J. Interferon activation and innate immunity. *Rev. Immunogenet.* **2**, 374–386 (2000).
244. Murray, H. W. Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann. Intern. Med.* **108**, 595–608 (1988).
245. Kim, K.-S., Chapman, N. M. & Tracy, S. Replication of Coxsackievirus B3 in Primary Cell Cultures Generates Novel Viral Genome Deletions. *J. Virol.* **82**, 2033 (2008).

246. Bouin, A. *et al.* Major Persistent 5' Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in Human Endomyocardial Tissues. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1488 (2016).
247. Xu, J. *et al.* Replication defective viral genomes exploit a cellular pro-survival mechanism to establish paramyxovirus persistence. *Nat. Commun.* **8**, 799 (2017).
248. Sidhu, M. S. *et al.* Defective measles virus in human subacute sclerosing panencephalitis brain. *Virology* **202**, 631–641 (1994).
249. Smithee, S., Tracy, S. & Chapman, N. M. Mutational Disruption of cis-Acting Replication Element 2C in Coxsackievirus B3 Leads to 5'-Terminal Genomic Deletions. *J. Virol.* **89**, 11761–11772 (2015).
250. Domingo, E. *et al.* Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**, 51–82 (2006).
251. Corsten, M. F., Schroen, B. & Heymans, S. Inflammation in viral myocarditis: friend or foe? *Trends Mol. Med.* **18**, 426–437 (2012).
252. Chapman, N. M. & Kim, K. S. Persistent coxsackievirus infection: enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **323**, 275–292 (2008).
253. Domingo, E., Biebricher, C., Eigen, M. & Holland, J. J. *Quasispecies as RNA virus evolution: Principles and consequences.* (2000).
254. Poirier, E. Z. & Vignuzzi, M. Virus population dynamics during infection. *Curr. Opin. Virol.* **23**, 82–87 (2017).
255. Poirier, E. Z. *et al.* Low-Fidelity Polymerases of Alphaviruses Recombine at Higher Rates To Overproduce Defective Interfering Particles. *J. Virol.* **90**, 2446–2454 (2016).
256. Woodman, A., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Evans, D. J. Biochemical and genetic analysis of the role of the viral polymerase in enterovirus recombination. *Nucleic Acids Res.* **44**, 6883–6895 (2016).

257. López, C. B. Defective viral genomes: critical danger signals of viral infections. *J. Virol.* **88**, 8720–8723 (2014).
258. Perrault, J. Origin and replication of defective interfering particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **93**, 151–207 (1981).
259. Lazzarini, R. A., Keene, J. D. & Schubert, M. The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* **26**, 145–154 (1981).
260. Pringle, C. R. Rhabdovirus Genetics. *The Rhabdoviruses* 167–243 (1987)  
doi:10.1007/978-1-4684-7032-1\_5.
261. Salinas, Y. & Roux, L. Replication and packaging properties of short Paramyxovirus defective RNAs. *Virus Res.* **109**, 125–132 (2005).
262. Manzoni, T. B. & López, C. B. Defective (interfering) viral genomes re-explored: impact on antiviral immunity and virus persistence. *Future Virol.* **13**, 493–503 (2018).
263. Vignuzzi, M. & López, C. B. Defective viral genomes are key drivers of the virus-host interaction. *Nat. Microbiol.* **4**, 1075–1087 (2019).
264. Dimmock, N. J. & Easton, A. J. Defective Interfering Influenza Virus RNAs: Time To Reevaluate Their Clinical Potential as Broad-Spectrum Antivirals? *J. Virol.* **88**, 5217–5227 (2014).
265. Baltes, A., Akpınar, F., Inankur, B. & Yin, J. Inhibition of infection spread by co-transmitted defective interfering particles. *PloS One* **12**, e0184029 (2017).
266. Poirier, E. Z. *et al.* Low-Fidelity Polymerases of Alphaviruses Recombine at Higher Rates To Overproduce Defective Interfering Particles. *J. Virol.* **90**, 2446–2454 (2016).
267. Smithee, S., Tracy, S. & Chapman, N. M. Mutational disruption of the CRE(2C) in coxsackievirus B3 leads to 5' terminal genomic deletions. *J. Virol.* (2015)  
doi:10.1128/JVI.01308-15.

268. Sharma, N. *et al.* Functional role of the 5' terminal cloverleaf in Cocksackievirus RNA replication. *Virology* **393**, 238–249 (2009).
269. Lévêque, N. *et al.* Functional Consequences of RNA 5'-Terminal Deletions on Cocksackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *J. Virol.* **91**, (2017).
270. Lévêque, N. *et al.* Quantitative Genomic and Antigenomic Enterovirus RNA Detection in Explanted Heart Tissue Samples from Patients with End-Stage Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3378 (2012).
271. Barnabei, M. S., Sjaastad, F. V., Townsend, D., Bedada, F. B. & Metzger, J. M. Severe dystrophic cardiomyopathy caused by the enteroviral protease 2A-mediated C-terminal dystrophin cleavage fragment. *Sci. Transl. Med.* **7**, 294ra106-294ra106 (2015).
272. Xiong, D. *et al.* Inducible Cardiac-Restricted Expression of Enteroviral Protease 2A Is Sufficient to Induce Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* **115**, 94–102 (2007).
273. Badorff, C., Lee, G. H. & Knowlton, K. U. Enteroviral cardiomyopathy: bad news for the dystrophin-glycoprotein complex. *Herz* **25**, 227–232 (2000).
274. Badorff, C. *et al.* Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-based substrate analogue. *J. Biol. Chem.* **275**, 11191–11197 (2000).
275. Feng, Q. *et al.* Enterovirus 2Apro Targets MDA5 and MAVS in Infected Cells. *J. Virol.* **88**, 3369–3378 (2014).
276. Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Andino, R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**, 344–348 (2006).
277. McCarthy, M. K. & Morrison, T. E. Persistent RNA virus infections: do PAMPS drive chronic disease? *Curr. Opin. Virol.* **23**, 8–15 (2017).

278. Kirkwood, T. B. & Bangham, C. R. Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8685–8689 (1994).
279. Bangham, C. R. & Kirkwood, T. B. Defective interfering particles: effects in modulating virus growth and persistence. *Virology* **179**, 821–826 (1990).
280. Sikkel, M. B., Quint, J. K., Mallia, P., Wedzicha, J. A. & Johnston, S. L. Respiratory syncytial virus persistence in chronic obstructive pulmonary disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**, S63-70 (2008).
281. Tan, J. J. L. *et al.* Persistence of Zika virus in conjunctival fluid of convalescence patients. *Sci. Rep.* **7**, 11194 (2017).
282. Labadie, K. *et al.* Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J. Clin. Invest.* **120**, 894–906 (2010).
283. Chughtai, A. A., Barnes, M. & Macintyre, C. R. Persistence of Ebola virus in various body fluids during convalescence: evidence and implications for disease transmission and control. *Epidemiol. Infect.* **144**, 1652–1660 (2016).
284. Borgherini, G. *et al.* Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **47**, 469–475 (2008).
285. Tracy, S., Smithee, S., Alhazmi, A. & Chapman, N. Coxsackievirus can persist in murine pancreas by deletion of 5' terminal genomic sequences. *J. Med. Virol.* **87**, 240–247 (2015).
286. Xiong, D. *et al.* Inducible cardiac-restricted expression of enteroviral protease 2A is sufficient to induce dilated cardiomyopathy. *Circulation* **115**, 94–102 (2007).
287. Vasilijevic, J. *et al.* Reduced accumulation of defective viral genomes contributes to severe outcome in influenza virus infected patients. *PLoS Pathog.* **13**, e1006650 (2017).

288. Barral, P. M. *et al.* MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* **81**, 3677–3684 (2007).
289. Dimmock, N. J. & Easton, A. J. Cloned Defective Interfering Influenza RNA and a Possible Pan-Specific Treatment of Respiratory Virus Diseases. *Viruses* **7**, 3768–3788 (2015).
290. Barrett, A. D., Guest, A. R., Mackenzie, A. & Dimmock, N. J. Protection of mice infected with a lethal dose of Semliki Forest virus by defective interfering virus: modulation of virus multiplication. *J. Gen. Virol.* **65** ( Pt 11), 1909–1920 (1984).
291. Holland, J. J. & Doyle, M. Attempts to detect homologous autointerference in vivo with influenza virus and vesicular stomatitis virus. *Infect. Immun.* **7**, 526–531 (1973).
292. Martínez-Gil, L. *et al.* A Sendai virus-derived RNA agonist of RIG-I as a virus vaccine adjuvant. *J. Virol.* **87**, 1290–1300 (2013).
293. Mercado-López, X. *et al.* Highly immunostimulatory RNA derived from a Sendai virus defective viral genome. *Vaccine* **31**, 5713–5721 (2013).
294. Shingai, M. *et al.* Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 6123–6133 (2007).
295. Xue, J., Chambers, B. S., Hensley, S. E. & López, C. B. Propagation and Characterization of Influenza Virus Stocks That Lack High Levels of Defective Viral Genomes and Hemagglutinin Mutations. *Front. Microbiol.* **7**, 326 (2016).
296. Bellocq, C., Mottet, G. & Roux, L. Wide occurrence of measles virus subgenomic RNAs in attenuated live-virus vaccines. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* **18**, 337–343 (1990).
297. McLaren, L. C. & Holland, J. J. Defective interfering particles from poliovirus vaccine and vaccine reference strains. *Virology* **60**, 579–583 (1974).

298. Gould, P. S., Easton, A. J. & Dimmock, N. J. Live Attenuated Influenza Vaccine contains Substantial and Unexpected Amounts of Defective Viral Genomic RNA. *Viruses* **9**, (2017).
299. Xu, J. *et al.* Identification of a Natural Viral RNA Motif That Optimizes Sensing of Viral RNA by RIG-I. *mBio* **6**, e01265-01215 (2015).
300. Notton, T., Sardanyés, J., Weinberger, A. D. & Weinberger, L. S. The case for transmissible antivirals to control population-wide infectious disease. *Trends Biotechnol.* **32**, 400–405 (2014).
301. Rast, L. I. *et al.* Conflicting Selection Pressures Will Constrain Viral Escape from Interfering Particles: Principles for Designing Resistance-Proof Antivirals. *PLoS Comput. Biol.* **12**, e1004799 (2016).
302. Chapman, N. M., Kim, K.-S., Drescher, K. M., Oka, K. & Tracy, S. 5' terminal deletions in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. *Virology* **375**, 480–491 (2008).
303. Kim, K.-S., Chapman, N. M. & Tracy, S. Replication of coxsackievirus B3 in primary cell cultures generates novel viral genome deletions. *J. Virol.* **82**, 2033–2037 (2008).
304. Kim, K.-S. *et al.* 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J. Virol.* **79**, 7024–7041 (2005).
305. Reikine, S., Nguyen, J. B. & Modis, Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front. Immunol.* **5**, 342 (2014).
306. Chapman, N. M., Kim, K.-S., Drescher, K. M., Oka, K. & Tracy, S. 5' terminal deletions in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. *Virology* **375**, 480–491 (2008).

307. Bouin, A. *et al.* Enterovirus Persistence in Cardiac Cells of Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy Is Linked to 5' Terminal Genomic RNA-Deleted Viral Populations With Viral-Encoded Proteinase Activities. *Circulation* **139**, 2326–2338 (2019).
308. Feng, Q. *et al.* MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep.* **2**, 1187–1196 (2012).
309. Feng, Q. *et al.* Coxsackievirus Cloverleaf RNA Containing a 5' Triphosphate Triggers an Antiviral Response via RIG-I Activation. *PLoS ONE* **9**, e95927 (2014).
310. Lévêque, N. *et al.* Functional Consequences of RNA 5'-Terminal Deletions on Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *J. Virol.* **91**, (2017).
311. Muehlenbachs, A., Bhatnagar, J. & Zaki, S. R. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J. Pathol.* **235**, 217–228 (2015).
312. Wessely, R., Klingel, K., Knowlton, K. U. & Kandolf, R. Cardioselective infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication. *Circulation* **103**, 756–761 (2001).
313. Lévêque, N. *et al.* Quantitative genomic and anti-genomic human enterovirus RNA detection in explanted heart tissue samples of patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* (2012) doi:10.1128/JCM.01612-12.
314. Lévêque, N. *et al.* Functional Consequences of RNA 5'-Terminal Deletions on Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *J. Virol.* **91**, (2017).
315. Weber, F., Kochs, G. & Haller, O. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol.* **17**, 498–515 (2004).

316. Bouin, A. *et al.* Enterovirus Persistence in Cardiac Cells of Patients Suffering From Idiopathic Dilated Cardiomyopathy is Linked to 5' Terminal Genomic RNA-Deleted Viral Populations With Viral-Encoded Proteinase Activities. *Circulation* (2019) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035966.
317. Rose, N. R. Critical cytokine pathways to cardiac inflammation. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **31**, 705–710 (2011).
318. Baccala, R. *et al.* Type I interferon is a therapeutic target for virus-induced lethal vascular damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8925–8930 (2014).
319. Teijaro, J. R. Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr. Opin. Virol.* **16**, 31–40 (2016).
320. Ertel, K. J., Brunner, J. E. & Semler, B. L. Mechanistic Consequences of hnRNP C Binding to Both RNA Termini of Poliovirus Negative-Strand RNA Intermediates. *J. Virol.* **84**, 4229 (2010).
321. Hyde, J. L. *et al.* The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs--Non-coding is not non-functional. *Virus Res.* **206**, 99–107 (2015).
322. Chigbu, D. I., Loonawat, R., Sehgal, M., Patel, D. & Jain, P. Hepatitis C Virus Infection: Host-Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells* **8**, (2019).
323. Scott, P. D., Meng, B., Marriott, A. C., Easton, A. J. & Dimmock, N. J. Defective interfering virus protects elderly mice from influenza. *Virol. J.* **8**, 212 (2011).
324. Sun, Y. *et al.* Immunostimulatory Defective Viral Genomes from Respiratory Syncytial Virus Promote a Strong Innate Antiviral Response during Infection in Mice and Humans. *PLoS Pathog.* **11**, e1005122 (2015).
325. Tapia, K. *et al.* Defective viral genomes arising in vivo provide critical danger signals for the triggering of lung antiviral immunity. *PLoS Pathog.* **9**, e1003703 (2013).

326. Vasilijevic, J. *et al.* Reduced accumulation of defective viral genomes contributes to severe outcome in influenza virus infected patients. *PLoS Pathog.* **13**, e1006650 (2017).
327. Fuller, F. J. & Marcus, P. I. Interferon induction by viruses. IV. Sindbis virus: early passage defective-interfering particles induce interferon. *J. Gen. Virol.* **48**, 63–73 (1980).
328. Tapia, K. *et al.* Defective Viral Genomes Arising In Vivo Provide Critical Danger Signals for the Triggering of Lung Antiviral Immunity. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
329. Yount, J. S., Kraus, T. A., Horvath, C. M., Moran, T. M. & López, C. B. A novel role for viral-defective interfering particles in enhancing dendritic cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 4503–4513 (2006).
330. Strahle, L., Garcin, D. & Kolakofsky, D. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* **351**, 101–111 (2006).
331. Ho, T.-H. *et al.* PACT- and RIG-I-Dependent Activation of Type I Interferon Production by a Defective Interfering RNA Derived from Measles Virus Vaccine. *J. Virol.* **90**, 1557–1568 (2016).
332. Rabinowitz, S. G. & Huprikar, J. The influence of defective-interfering particles of the PR-8 strain of influenza A virus on the pathogenesis of pulmonary infection in mice. *J. Infect. Dis.* **140**, 305–315 (1979).
333. Johnston, M. D. The characteristics required for a Sendai virus preparation to induce high levels of interferon in human lymphoblastoid cells. *J. Gen. Virol.* **56**, 175–184 (1981).
334. Baczko, K. *et al.* Expression of defective measles virus genes in brain tissues of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Virol.* **59**, 472–478 (1986).
335. Kell, A. M. & Gale, M. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* **479–480**, 110–121 (2015).

336. Weber-Gerlach, M. & Weber, F. Standing on three legs: antiviral activities of RIG-I against influenza viruses. *Curr. Opin. Immunol.* **42**, 71–75 (2016).
337. Yamada, S. *et al.* RIG-I-Like Receptor and Toll-Like Receptor Signaling Pathways Cause Aberrant Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines in a Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection Mouse Model. *J. Virol.* **92**, (2018).
338. Spengler, J. R. *et al.* RIG-I Mediates an Antiviral Response to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J. Virol.* **89**, 10219–10229 (2015).
339. Spiropoulou, C. F. *et al.* RIG-I activation inhibits ebolavirus replication. *Virology* **392**, 11–15 (2009).
340. Loo, Y.-M. *et al.* Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J. Virol.* **82**, 335–345 (2008).
341. Deddouche, S. *et al.* Identification of an LGP2-associated MDA5 agonist in picornavirus-infected cells. *eLife* **3**, e01535 (2014).
342. Luo, R. *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon-beta production by interfering with the RIG-I signaling pathway. *Mol. Immunol.* **45**, 2839–2846 (2008).
343. van Kasteren, P. B. *et al.* Arterivirus and nairovirus ovarian tumor domain-containing Deubiquitinases target activated RIG-I to control innate immune signaling. *J. Virol.* **86**, 773–785 (2012).
344. Zhang, Z. *et al.* Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- $\beta/\lambda$  responses in hepatocytes. *J. Hepatol.* **69**, 25–35 (2018).
345. Zhao, Y., Ye, X., Dunker, W., Song, Y. & Karijolich, J. RIG-I like receptor sensing of host RNAs facilitates the cell-intrinsic immune response to KSHV infection. *Nat. Commun.* **9**, 4841 (2018).

346. Gokhale, N. S. & Horner, S. M. RNA modifications go viral. *PLoS Pathog.* **13**, e1006188 (2017).
347. Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* **23**, 165–175 (2005).
348. Gonzales-van Horn, S. R. & Sarnow, P. Making the Mark: The Role of Adenosine Modifications in the Life Cycle of RNA Viruses. *Cell Host Microbe* **21**, 661–669 (2017).
349. Lichinchi, G. *et al.* Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* **20**, 666–673 (2016).
350. Taylor, L. A. *et al.* Host gene regulation during coxsackievirus B3 infection in mice: assessment by microarrays. *Circ. Res.* **87**, 328–334 (2000).
351. Bolu, A. *et al.* Serum Levels of High Sensitivity C-reactive Protein in Drug-naïve First-episode Psychosis and Acute Exacerbation of Schizophrenia. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci. Off. Sci. J. Korean Coll. Neuropsychopharmacol.* **17**, 244–249 (2019).
352. Raio, L. *et al.* Ultra-high sensitive C-reactive protein during normal pregnancy and in preeclampsia: a pilot study. *J. Hypertens.* **37**, 1012–1017 (2019).
353. Van der Touw, T., Andronicos, N. M. & Smart, N. Is C-reactive protein elevated in obstructive sleep apnea? a systematic review and meta-analysis. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* **24**, 429–435 (2019).
354. Zimmermann, O. *et al.* Myocardial inflammation and non-ischaemic heart failure: is there a role for C-reactive protein? *Basic Res. Cardiol.* **104**, 591–599 (2009).
355. Komarova, A. V. *et al.* Proteomic analysis of virus-host interactions in an infectious context using recombinant viruses. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **10**, M110.007443 (2011).

356. Komarova, A. V. *et al.* Identification of RNA partners of viral proteins in infected cells. *RNA Biol.* **10**, 944–956 (2013).

## Cas-image

Virologie 2020, xx (x) : 1-3

## Impact des Entérovirus-B tronqués en région 5'NC sur la réponse IFN de type I dans les cardiomyocytes humains

Q1

Marie Glenet<sup>1</sup>  
 Anne-Laure Lebreil<sup>1</sup>  
 Fatma Berri<sup>1</sup>  
 Laurent Andreoletti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Virologie, EA4684, CardioVir, Faculté de médecine, Université de Reims Champagne Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France

<sup>2</sup> CHU Robert Debré, Laboratoire de Virologie médicale et moléculaire

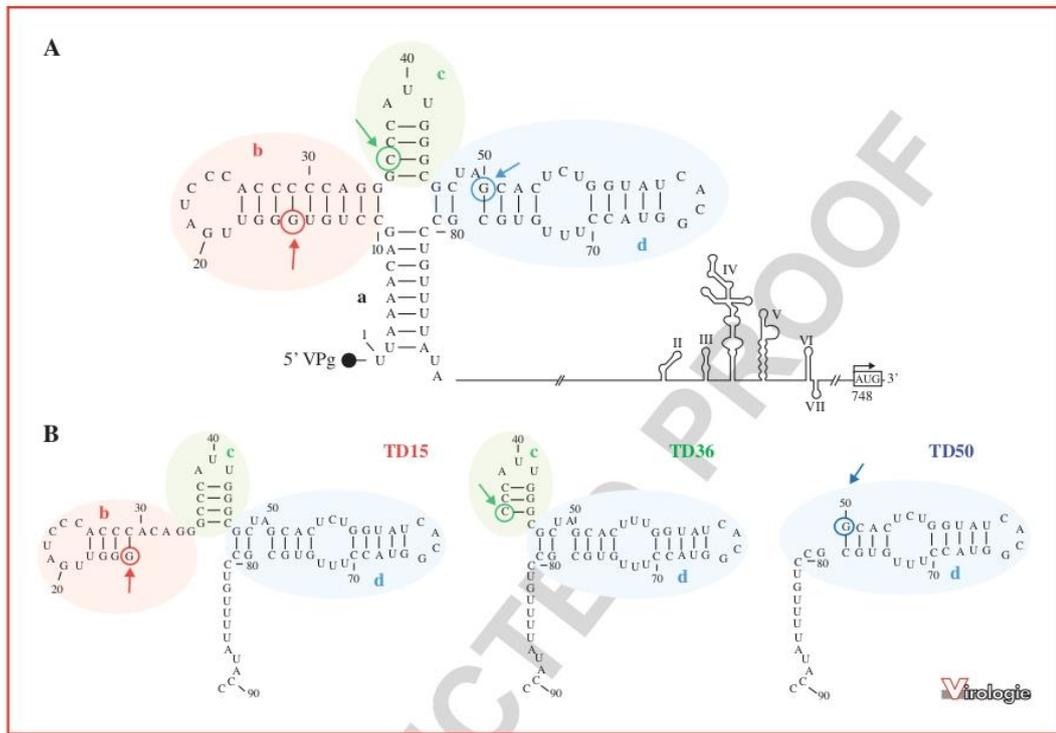
Les virus Coxsackie du groupe B (*Picornaviridae*) sont des virus non enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. Ils sont l'un des principaux facteurs étiologiques infectieux de myocardites aiguës qui peuvent évoluer dans 10 % des cas vers la myocardite chronique puis vers la phase clinique de cardiomyopathie dilatée ; cette pathologie chronique est actuellement la seconde cause de transplantation cardiaque dans le monde après les cardiomyopathies ischémiques. À ce jour, les mécanismes viraux impliqués dans l'évolution de la myocardite aiguë vers la phase chronique de la maladie ne sont pas totalement élucidés mais pourraient être liés à la persistance de populations virales caractérisées par des délétions nucléotidiques dans la région 5' non-codante (NC) et plus spécifiquement dans la structure en feuille de trèfle « *Cloverleaf* » (CL) (*figure 1A*). En 2008, Chapman *et al.* ont rapporté la présence de séquences d'ARN de virus Coxsackie B2 (CVB2) tronquées en région 5'NC dans un prélèvement cardiaque réalisé chez un patient décédé d'une myocardite fulminante [1]. Entre 2014 et 2018, notre groupe de recherche a démontré par une approche de séquençage haute débit (NGS, *Next-Generation Sequencing*) que les populations virales persistantes dans les explants cardiaques de patients souffrant d'une cardiomyopathie chronique étaient composées d'une majorité de formes virales tronquées en 5'NC (95%) (tronquées de 15 à 50 nucléotides) associées à une

proportion minoritaire (< 5 %) de formes virales complètes d'entérovirus du groupe B (EV-B) [2]. Nous avons montré que les populations entérovirales persistantes majoritaires présentaient des délétions de 15 à 50 nucléotides à l'extrémité de la région 5'NC modifiant ainsi la structure secondaire en feuille de trèfle (*figure 1A, 1B*). Le clonage et la transfection dans des cardiomyocytes primaires humains en culture (HCM) des ARN synthétiques viraux (complet et tronqué de 50 nucléotides) précédemment identifiés chez les patients, ont révélé que l'activité catalytique de la protéase virale 2A était responsable de l'altération des fonctions cellulaires cardiaques [3]. Ces données cliniques et expérimentales supportent le concept d'émergence et de sélection de populations EVB-t répliquatives en association avec des formes complètes. De telles données apportent un éclairage nouveau sur les mécanismes virologiques de persistance des populations d'entérovirus du groupe B (EV-B) dans les cellules cardiaques humaines [3]. Ces formes virales tronquées avec structures secondaires d'ARN 5'NC modifiées pourraient moduler la sécrétion d'IFN de type I et la transcription des gènes stimulés par les IFN aboutissant à un mécanisme d'évasion du système immunitaire innée et à la persistance du virus dans le cœur. En 2014, Feng *et al.* ont démontré que le domaine en feuille de trèfle de l'ARN de CVB3 contenant une structure 5' triphosphate était suffisant pour induire une réponse IFN de type I ainsi qu'un large panel de cytokines pro-inflammatoires *via* les voies de signalisation des RLRs (*RIG-I Like Receptors* ; RIG-I, MDA5 et LGP2) [4].

Correspondance Q2

Virologie, Vol xx, n° x, xxx 2020

Pour citer cet article : Glenet M, Lebreil AL, Berri F, Andreoletti L. Impact des Entérovirus-B tronqués en région 5'NC sur la réponse IFN de type I dans les cardiomyocytes humains. *Virologie* 2020; xx(x) : 1-3 doi:10.1684/vir.2020.0836



**Figure 1. A) Représentation schématique de la région 5' non-codante de l'ARN d'entérovirus du groupe B (EV-B).** Structures secondaires référencées en feuille de trèfle composée d'une tige « a » et trois tiges-boucles (« b », « c » et « d »), nécessaires à la réplication virale. Le site d'entrée interne du ribosome (IRES) avec des tige-boucles II à VII indispensables à la traduction. Les flèches indiquent la position du premier nucléotide (entouré) suite aux délétions (TD15 en rouge, TD36 en vert et TD50 en bleu). **B) Représentation schématique des formes tronquées de 15 nucléotides (TD15)** avec perte de la tige « a », des formes tronquées de 36 nucléotides (TD36) avec la perte de la tige « a » et de la tige-boucle « b » et enfin des formes tronquées de 50 nucléotides (TD50) avec perte de la tige « a » et des tiges-boucles « b » et « c ».

Afin d'explorer la capacité de ces populations virales à induire une réponse immunitaire innée *via* l'activation de la voie de signalisation des IFN de type I et d'évaluer l'impact potentiel des proportions d'EV-B-t sur les senseurs de l'immunité, des ARN viraux synthétiques non phosphorylés et tronqués de différentes tailles (de 15 nucléotides TD15, de 36 nucléotides TD36, et de 50 nucléotides TD50 ; *figure 1B*) en région 5' terminale ont été transfectés dans des HCM. Nos résultats démontrent que les populations minoritaires complètes et tronquées de 8 à 36 nt induisaient des taux d'expressions de transcrits d'IFN- $\beta$  et d'ISG56 (*Interferon Stimulated Gene 56*) significativement plus élevés que les populations majoritaires tronquées de plus de 36 nt. Nos résultats ont confirmé le rôle important de la structure en feuille de trèfle des EV-B [4]. De plus ils ont permis de mettre en évidence l'importance des séquences de la tige-boucle « c » localisée entre les nucléotides 37 et 50 dans l'activation de la voie de production des IFN de type I

(*figure 1A*). En conclusion, ces travaux originaux montrent que des modifications conformationnelles induites par les délétions des tige-boucles « a » et « b » de la structure en feuille de trèfle (région 5'NC) pourraient permettre aux ARN des EV-B d'échapper à la reconnaissance par les senseurs de l'immunité de type RLRs, autorisant ainsi une persistance virale dans les cardiomyocytes au cours de la myocardite chronique et de la phase de cardiomyopathie dilatée [5-7].

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article. **Q3**

**Références**

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

2. Bouin A, Nguyen Y, Wehbe M, Renois F, Fomes P, Bani-Sadr F, *et al.* Major Persistent 5' Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in Human Endomyocardial Tissues. *Emerging Infect Dis* 2016; 22: 1488-90.
3. Bouin A, Gretteau PA, Wehbe M, Renois F, N'Guyen Y, Leveque N, *et al.* Enterovirus Persistence in Cardiac Cells of Patients Suffering From Idiopathic Dilated Cardiomyopathy is Linked to 5' Terminal Genomic RNA-Deleted Viral Populations With Viral-Encoded Proteinase Activities. *Circulation* 2019. Q4.
4. Feng Q, Langereis MA, Olnagier D, Chiang C, van de Winkel R, van Essen P, *et al.* Coxsackievirus cloverleaf RNA containing a 5' triphosphate triggers an antiviral response via RIG-I activation. *PLoS ONE* 2014; 9: e95927.
5. Wang JP, Cerny A, Asher DR, Kurt-Jones EA, Bronson RT, Finberg RW. MDA5 and MAVS mediate type I interferon responses to coxsackie B virus. *J Virol* 2010; 84: 254-60.
6. Feng Q, Hato SV, Langereis MA, Zoll J, Virgen-Slane R, Peisley A, *et al.* MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep* 2012; 2: 1187-96.
7. Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol* 2010; 20: 4-22.

---

## **Impact des ARN génomiques des Entérovirus-B tronqués en région 5' non-codante sur l'activation de la réponse interféron de type I dans les cardiomyocytes humains**

---

Des ARN génomiques d'Entérovirus du groupe-B (EV-B)) tronquées en région 5' non-codante ont été associés au développement de cardiomyopathies humaines. L'impact de ces ARN génomiques viraux sur l'activation de la réponse interféron (IFN) de type I dans les cellules cibles reste inconnu. Dans des cas de myocardite humaine ou expérimentale à EV-B, nous avons identifié par RACE-PCR différentes formes d'ARN tronquées dont les proportions étaient corrélées positivement ou négativement aux niveaux IFN- $\beta$  dans les tissus cardiaques. Par transfection de formes synthétiques complètes ou tronquées d'ARN CV-B3 dans des proportions imitant celles observées chez les patients dans des cardiomyocytes, nous avons démontré que la structure "d" du domaine I de l'ARN EV-B possède un motif immunomodulateur de cinq nucléotides responsable de l'induction de la voie IFN- $\beta$ . En utilisant des cellules STING-37 knockdown pour chaque RLR (RIG-I ou MDA5), nous avons montré que la détection des formes d'ARN 5'TD caractérisées par la perte de ce motif nucléotidique était dépendante de RIG-I et associée à un rétrocontrôle négatif de LGP2, ce qui entraîne une diminution de la réponse IFN- $\beta$  dans les cellules infectées. En revanche, la détection immunitaire innée des formes FL ou 5'TD avec une tige-boucle "d" conservée était dépendante de MDA5 et associée à des niveaux plus élevés d'IFN- $\beta$ . Les délétions naturelles de nucléotides affectant le domaine I de la région 5'NC du génome EV-B modulent la détection immunitaire de l'ARN viral par les RLRs. Ces données ouvrent de nouvelles perspectives d'immunothérapie ciblées visant à induire une clairance des tissus cardiaques humains infectées par les EV-B.

---

**Mots-clés :** Entérovirus du groupe B, Délétion génomique en région 5'NC, Myocardite aiguë, Interférons de type 1, Récepteurs de type RIG-I, Immunité innée

---

### **Impact of 5'terminally deleted Group-B Enterovirus genomic RNA forms on type I interferon pathway induction in human cardiomyocytes**

---

Group-B Enterovirus (EV-B) genomic RNA forms with deletions in 5' non-coding region (5'NC) have been associated with the development of acute or chronic human cardiomyopathies. The impact of 5'terminally deleted (5'TD) viral genomic RNA populations on type I interferon response activation in target cells remains unknown. In human and murine cardiac biopsies collected during EV-B myocarditis, we identified by a RACE-PCR approach different natural 5'NC deleted RNA forms whose proportions were correlated positively or negatively to IFN- $\beta$  levels in cardiac tissues. Through transfection of synthetic full-length or 5' TD CV-B3 RNA forms alone or associated in proportions mimicking those observed in acute viral populations into human cardiomyocytes, we demonstrated that stem-loop "d" structure of EV-B RNA domain I possesses an immunomodulatory five nucleotide motif responsible for IFN- $\beta$  pathway induction. Using STING-37 knockdown cells for each RLRs (RIG-I or MDA5), we evidenced that the sensing of 5'TD RNA forms characterized by the loss of this nucleotide motif was RIG-I-dependent and associated with an LGP2 negative feedback, resulting in IFN- $\beta$  response decrease in infected cells. By contrast, the innate immune sensing of FL or 5'TD forms with conserved stem-loop "d" structure was MDA5-dependent sensing and associated with higher IFN- $\beta$  levels. Natural nucleotide deletions affecting domain I of 5'NC region of EV-B genome modulate the immune sensing of viral RNA by RLRs. These data should stimulate the development of target immunotherapies to restore an efficient antiviral innate immune response and potentially to achieve a viral clearance of human EV-B infected heart tissues.

---

**Key words:** Group B Enterovirus, 5'NC genomic deletions, Acute myocarditis, type-1 Interferons, RIG-I-like-receptors, Innate immunity

---

**Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Spécialité : Microbiologie, maladies transmissibles et hygiène**

---

Université de Reims Champagne-Ardenne  
CardioVir – EA 4684  
51 Rue Cognacq Jay - 51100 Reims