Écoles Doctorales .urca

Sciences Fondamentales
Santé

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

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 : Virologie

Présentée et soutenue publiquement par

Domitille CALLON

Le 18 janvier 2023

Impact des ARN génomiques des entérovirus-B tronqués en région 5'non-codante sur leur pathogénicité et sur la réponse interféron de type 1 dans les cardiomyocytes et les cellules bêta-pancréatiques *in vivo* et *in vitro*

Thèse co-dirigée par **LES PROFESSEURS LAURENT ANDREOLETTI ET PAUL FORNÈS**

JURY

Mme Caroline TAPPAREL-VU,	Professeur,	à l'Université de Genève,	**Présidente**
M. Laurent ANDREOLETTI,	Professeur,	à l'Université Reims Champagne Ardennes,	**Directeur de thèse**
M. Paul FORNÈS,	Professeur,	à l'Université Reims Champagne Ardennes,	**Co-Directeur de thèse**
M. Onnik AGBULUT,	Professeur,	à la Sorbonne Université de Paris,	**Rapporteur**
M. Jean-Pierre VARTANIAN,	Professeur,	à l'Institut Pasteur de Paris,	**Rapporteur**

Sciences Fondamentales
Santé

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 : Virologie

Présentée et soutenue publiquement par

Domitille CALLON

Le 18 janvier 2023

Impact des ARN génomiques des entérovirus-B tronqués en région 5'non-codante sur leur pathogénicité et sur la réponse interféron de type 1 dans les cardiomyocytes et les cellules bêta-pancréatiques *in vivo* et *in vitro*

Thèse co-dirigée par **LES PROFESSEURS LAURENT ANDREOLETTI ET PAUL FORNÈS**

JURY

Mme Caroline TAPPAREL-VU,	Professeur,	à l'Université de Genève,	**Présidente**
M. Laurent ANDREOLETTI,	Professeur,	à l'Université Reims Champagne Ardennes,	**Directeur de thèse**
M. Paul FORNÈS,	Professeur,	à l'Université Reims Champagne Ardennes,	**Co-Directeur de thèse**
M. Onnik AGBULUT,	Professeur,	à la Sorbonne Université de Paris,	**Rapporteur**
M. Jean-Pierre VARTANIAN,	Professeur,	à l'Institut Pasteur de Paris,	**Rapporteur**

Remerciements

À mes directeurs de Thèse,

Au Professeur Paul Fornès,

« *Le hasard n'existe pas.* »

Cher Maître, je n'ai toujours pas trouvé les mots pour vous remercier.

Il n'y en a pas de suffisamment fort.

Je porterai de mon mieux votre héritage : humanité, bienveillance, compétence, exigence.

Au Professeur Laurent Andreoletti,

« *En tout bien, tout honneur.* »

Vous avez construit une équipe merveilleuse, CardioVir mérite qu'on s'y attache.

Vous m'avez laissée poser mes valises, apprendre et progresser…

Malgré quelques orages, je n'aurai pas imaginé une autre aventure pour me plonger dans la recherche.

Aux Professeurs Onnik Agbulut et Jean-Pierre Vartanian,

Pour leur enthousiasme, leur gentillesse et leurs conseils bienveillants,

Et pour l'honneur qu'ils me font en critiquant ce travail : tous les voyants sont au vert !

Je suis impatiente de poursuivre mes travaux avec vous et vos équipes.

Au Professeur Caroline Tapparel,

Pour me faire l'honneur de juger ces travaux,

Votre enthousiasme et votre gentillesse pour préparer la présidence de ce jury,

Soyez assurée de ma profonde gratitude.

À ma famille,

À ceux qui sont partis trop tôt, mais qui sont avec moi pour toujours : mon petit frère, Ann-Philippe, qui ne m'a jamais quittée, Papy et Mamie, mon grand-oncle, Emmanuel, Pepy ; Martine et Chantale « Tatale », qui étaient comme la famille. Vous me manquez terriblement.

À ma tribu : mes parents, auxquels je dois tout, tout simplement ; mes sœurs, Charlotte (meilleure pharmacien de France !) et Sidonie (Docteur Sidoche), mon frère, Ann-Raphaël (mon bro-gros), toujours là pour me soutenir avec humour et fraternité ; Mémie, toujours prête à jardiner avec moi, pour longtemps encore !! Au beau-frère Thibault, pour nous régaler à la Grosse B. et à Claudia, ma nièce et filleule adorée.

Pour tout votre amour, votre soutien sans compter, vos conseils... Je vous aime.

À mon parrain, Fabien, et sa merveilleuse famille (Hilde, Charlotte, Isabelle), avec toute mon amitié.

À ma marraine, Sophie et sa famille, avec toute mon amitié.

À Agnès, « Nénésse/Tata Poirier », et Michel, pour toutes les soirées (même si les souvenirs sont flous) !

À la famille Dupont-Gaudin, Florence et Hervé, et mes cousins de cœur, Victor et Clémentine.

À Olivier et Laurence, nos chers voisins des Fleurs, pour ces fins de soirées dans la piscine…

À Arnaud, Magalie, Brice et Mattéo, pour partager tant de moments avec nous, et votre soutien familial.

À Yves, pour me supporter au quotidien et soulager mon quotidien, à chaque moment de doute, et Dieu sait qu'il y en a eu. Je ne serais pas allée aussi loin sans toi, quoi que tu dises. Merci de me faire garder les pieds sur terre… avec tout mon amour.

À ma basse-cour : Tsukuyomi, Roxy, Catherine, Becky et Yayane, pour me donner le sourire instantanément à chaque retour à la maison.

À vous tous, je dédie mes travaux.

À mes amis,

Les anciens, comme les nouveaux :

- D'abord, bien sûr, l'équipe d'intégration 2013-2014, *This is medicinnnnnne*… ! :
    - Soumiya, que dire, tu me manques tellement… Loin des yeux mais près, très près, du cœur…
    - Pierre-Arnaud, ma Tsundere préférée ! Pars pas trop loin s'il te plait, tu vas me manquer…
    - Paul le Poulpe, le seul et unique Tropicologue.
    - Alexandre, Ragnagna, et ta grande gueule, continue d'enseigner, tu es fait pour ça.
    - Et Cyril, n'oublie pas, on ne dort pas dans une voiture qu'on ne connait pas.

- Les rencontres au fils des études :
    - Arnaud et Delphine, le duo de choc Whisky/Plancha/Chien, que du bonheur…
    - Melody, qui sera la meilleure cardiopédiatre de Reims, que dis-je du monde !
    - Chloé, encore une pédiatre, mais néphropédiatre, t'as intérêt à assurer !
    - Kelly et Aurel, et Alaric et Odin bien sûr,
    - Victor, ze Pr cardiologue to be,
    - Raphaël « Raphou » aka « le copain de Soussou »,
    - Edouard, Sarah, Catherine, Amélie, Pauline, Romain, Mickaël, Marine, et tant d'autres !

- Julien et Johan, les collègues de galère en Master 2R et thèse PhD, bon courage !

- L'équipe FERM : Aline, Laurent, Maxime, Betty, Céline, Véronique, Anne-Cécile, Amélie, et tous les bénévoles : quand on a une même passion d'enseignement et d'entraide, on ne peut que s'entendre !

- Diane, le temps a effacé les disputes d'ado, j'espère que nous serons encore amie d'enfance pour longtemps, j'attends ton retour sur Reims !

- Lauriane, l'amie d'enfance, l'amie de toujours… Merci pour ton soutien indéfectible au fil des années. Je te souhaite tellement de bonheur, tout le temps ! Tu pourras toujours compter sur mon soutien et mon amour.

À la famille CardioVir,

- À Fatma, de collègue, tu es devenue amie : sans toi, pas de thèse, car tu as été et es toujours mon pilier moral indéfectible (et technique, même si en biomol tu peux t'améliorer tmtc) … Merci pour tout, du fond du cœur, et je viendrai toujours « chanter aux souris » avec toi !
- À Anne-Laure, qui a su garder la pêche en génotypage, en clonage etc. On se souviendra longtemps d'un certain Monsieur P… Je serai toujours là pour génotyper avec toi !
- À Marie, pour son infatigabilité à la tâche et son avenir brillant : reste zen en famille, pense à toi, et sois forte !
- À Laetitia, pour sa bonne humeur constante, ses peurs paniques quand je surgissais dans les couloirs et sa délicieuse sauce Satay faite maison ! Courage tu touches au but !
- À Manon, normande, et qui le montre ! Au fond, on mange aussi du beurre salé et on boit du cidre… Bon courage pour ta thèse, sois forte !
- À Yohan, pour ton humour et ta dérision, ton soutien aussi !
- À Paul-Antoine, pour son aide précieuse, sa sagesse (!!) et son parcours, cher confrère !
- À Anne-Sophie, continue à gueuler et à faire entendre ta voix !
- À Aurélien, pour m'avoir fait l'honneur de diriger sa thèse et son M2R ! Bienvenue dans le service !
- À Thomas, bienvenue dans le bateau, accroche toi bien…
- À Maxime, QueenB, un plaisir de te redécouvrir après l'externat… Quel caractère surtout !
- À Léontine, même pour un cours instant, je te souhaite une belle continuation !

- Au café, qui a fait battre mon cœur bien trop vite et prolonger les pauses de façon très exagéré… mais pour la bonne cause !

- À nos surnoms et pour tous les merveilleux souvenirs qui vont avec, en chanson : la Poule, la Buse, la Chèvre, le Dindon, le Popo, le Scarabée, la Taupe, la Fourmi, Titine, Maximus… « *Et patati et patata* » « *C'est l'histoire de ma thèse* » « *T'en vas pas » « Money money money » « Aigle 4 »…*

Mes co-internes légistes, d'ici et d'ailleurs : Marie-Laure et Meriem, Aurélien, Eugénie, Marie, Iris et Mathilde…

Tous ceux que j'ai croisé au cours de mon parcours

- Nicole Bouland et Caroline Fichel, pour leur aide et leur bienveillance en technique histologique !
- Merci à Madame Valérie Piraube et au Pr Hamid Morjani (école doctorale) pour leur aide et leur bienveillance, administratives !

- L'équipe du laboratoire d'anatomo-pathologie du C.H.U de Reims : toutes les secrétaires, les techniciens, les internes (Amaury en première place) les médecins (Dr Camille Boulagnon-Rombi, pour ses conseils de vie en tant qu'HU !) qui m'ont aidée, soutenue, encouragée…

- L'équipe du laboratoire d'anatomo-pathologie de Troyes du Dr Sylvie Méhaut ;

- L'équipe du service de radiologie d'Epernay du Dr Camélia Cucu ;

- L'équipe du laboratoire de virologie du C.H.U de Reims : les techniciennes de biologie moléculaire, que je remercie pour leur patience et d'avoir supporté « *l'emmerdeuse et ses échantillons* » !

- Les amitiés et soutiens internationaux, au grès des congrès, voyages et des merveilleuses soirées… : Serena Starnazzi, Alexis Bouin, Bert Semler, Raul Andino, Frank Van Kuppeveld, Amparo Fernandez, Veroniek Sageaman.

- **Last but not least** : l'équipe de l'institut médico-légal de Reims : Maryline, Virginie, Sylvie, Willy, Lisette, Christian, Yoyo, Caroline, Laetitia, Grand Romain « Obélix », Petit Romain, Dylan, Amélie… Sans votre bienveillance, vos mots, votre bonne humeur, impossible de se battre pour sa passion !

- **Tous les voyants sont au vert !**

Γνῶθι σεαυτόν

« *Connais-toi toi-même* »

Maxime du Temple d'Apollon, Delphes

Impact des ARN génomiques des entérovirus-B tronqués en région 5'non-codante sur leur pathogénicité et sur la réponse interféron de type 1 dans les cardiomyocytes et les cellules bêta-pancréatiques *in vivo* et *in vitro*

Des ARN génomiques d'entérovirus-B tronqués en région 5'terminale non codante (EVB-TD) ont été associés à des myocardites aigues, des cardiomyopathies dilatées chroniques et au diabète de type 1. La pathogenèse n'est pas élucidée. Nous avons étudié chez la souris DBA/2J et dans des cultures de cardiomyocytes et de cellules bêta pancréatiques, l'impact de ces EVB-TD sur les activités de réplication virale, la réponse interféron de type 1 (IFN-1) et les fonctions des cellules cibles. Au cours de l'infection par le virus Coxsackie B3/28 (CVB3) nous avons montré l'émergence et le maintien d'une population virale majoritaire tronquée de 50 nucléotides en région 5'terminale (CVB3-TD50) aux phases aigue puis persistante, dans le cœur et le pancréas, avec respectivement une dégradation de la dystrophine et une diminution de l'expression d'insuline. La transfection d'ARN viraux synthétiques CVB3-TD50 chez la souris et dans des cardiomyocytes humains nous a permis de démontrer leur capacité à moduler l'activation de la voie IFN-1. De plus, leur transfection dans les cellules bêta pancréatiques a montré leur rôle dans la diminution du métabolisme de l'insuline. En conclusion, nos résultats montrent que l'émergence précoce et le maintien de formes majoritaires et réplicatives de CVB3-TD50 module l'activation de la voie IFN-1, favorisant le développement d'une infection persistante associée à un dysfonctionnement des cellules cardiaques et bêta pancréatiques.

Entérovirus, myocardite, diabète, interférons, pathogenèse

Impact of 5'terminally deleted RNA forms of group-B enterovirus on their pathogenicity and on type 1 interferon response in cardiomyocytes and pancreatic beta cells in vivo and in vitro

Enterovirus-B genomic RNA deleted in the 5'terminal non-coding region (EVB-TD) have been associated with acute myocarditis, chronic dilated cardiomyopathy and type 1 diabetes. The pathogenesis is not elucidated. In DBA/2J mice and in cultured cardiomyocytes and pancreatic beta cells, we studied the impact of these EVB-TD on viral replication activities, type 1 interferon (IFN-1) response and target cell functions. During infection with a Coxsackievirus B3/28 (CVB3), we showed the emergence and maintenance of a dominant viral population deleted of 50 nucleotides in the 5'terminal region (CVB3-TD50) at acute and persistent phases, in the heart and pancreas, with respectively a degradation of dystrophin and a decrease in insulin expression. The transfection of synthetic CVB3-TD50 viral RNA in mice and in human cardiomyocytes demonstrated their capacity to modulate the activation of the IFN-1 pathway. In addition, their transfection into pancreatic beta cells showed their role in decreasing insulin metabolism. In conclusion, our results show that the early emergence and maintenance of dominant and replicative forms of CVB3-TD50 modulates the activation of the IFN-1 pathway, leading to the development of a persistent infection associated with cardiac and pancreatic beta cell dysfunctions.

Enterovirus, myocarditis, diabetes, interferons, pathogenesis

Discipline :SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Virologie

Université de Reims Champagne-Ardenne

CardioVir – EA 4684

51 rue Cognacq Jay 51095 Reims

Table des matières

REMERCIEMENTS **2**

RESUME **8**

TABLE DES MATIERES **9**

LISTE DES FIGURES **11**

LISTE DES TABLEAUX **13**

LISTE DES ABREVIATIONS **14**

INTRODUCTION **17**

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE **20**

I. ENTEROVIRUS 21

A. Taxonomie *21*

B. Structure *22*

C. Cycle de réplication virale *26*

D. Évolution et adaptation cellulaire *35*

II. INFECTIONS PAR ENTEROVIRUS CHEZ L'HOMME 38

A. Épidémiologie *38*

B. Pathogenèse *40*

C. Pathogenèse cardiaque *44*

D. Pathogénèse pancréatique *55*

III. REPONSE IMMUNITAIRE 61

A. Immunité innée *62*

B. Les interférons *68*

C. Immunité cellulaire *72*

D. Immunité humorale ou adaptative *73*

E. Facteurs de restriction *73*

F. Echappement des entérovirus à la réponse immunitaire *75*

G. Auto-immunité *80*

IV. POPULATIONS D'ENTEROVIRUS AVEC ARN TRONQUE EN REGION 5'NON CODANTE 83

A. Caractérisation des populations virales tronquées en région 5'non codante *83*

B. Populations virales tronquées en région 5'non codante et quasi-espèces virales *84*

C. Pathogénicité des quasi-espèces tronquées en région 5'non codante *85*

D. Quasi-espèces tronquées en région 5'non codante et immunité antivirale *90*

PARTIE EXPÉRIMENTALE **93**

ARTICLE 1 : EARLY EMERGENCE OF 5' TERMINALLY DELETED COXSACKIEVIRUS-B3 RNA FORMS IS ASSOCIATED WITH ACUTE AND PERSISTENT INFECTIONS IN MOUSE TARGET TISSUES 95

ARTICLE 2 : REPLICATION ACTIVITIES OF MAJOR 5'TERMINALLY DELETED GROUP-B COXSACKIEVIRUS RNA FORMS DECREASE PCSK2 MRNA EXPRESSION IMPAIRING INSULIN MATURATION IN PANCREATIC BETA CELLS 113

ARTICLE 3 : REPLICATIVE GROUP-B ENTEROVIRUS POPULATIONS DELETED IN THE 5' NON-CODING REGION IN DOMAIN-I OF GENOMIC RNA MODULATE ACTIVATION OF THE TYPE 1 INTERFERON PATHWAY AND INDUCE MYOCARDITIS 134

DISCUSSION GÉNÉRALE 177

A. Emergence et distribution des populations virales 179

B. Métabolisme insulinique 181

C. Réponse immunitaire innée 182

CONCLUSION - PERSPECTIVES 184

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 187

ANNEXES 215

Annexe 1 : Master 1 Biologie – Santé – Qualité (Année 2015/2016, URCA) 216

Annexe 2 : Master 2 Biologie – Santé : Microenvironnement cellulaire et pathologies (Année 2018/2019, URCA) 217

Annexe 3 : Late-Onset Giant Cell Myocarditis Due to Enterovirus During Treatment with Immune Checkpoint Inhibitors 218

Annexe 4 : Structures and Functions of Viral 5' Non-Coding Genomic RNA Domain-I in Group-B Enterovirus Infections 222

Annexe 5 : L'autopsie : indispensable pour la connaissance et la prévention de la mort subite cardiaque 245

Annexe 6 : Myocarditis Presenting as Sudden Death in Infants and Children: A Single Centre Analysis by ESGFOR Study Group 257

Annexe 7 : Coinfection of Parvovirus B19 with Influenza A/H1N1 Causes Fulminant Myocarditis and Pneumonia. An Autopsy Case Report. 267

Annexe 8 : Fulminant Myocardial Involvement in Neonatal Echovirus-induced Sepsis. Two Autopsy Cases. 274

Liste des figures

Figure 1: Arbre phylogénétique des entérovirus 21
Figure 2: Morphologie des virions des entérovirus. 23
Figure 3: ARN génomique des entérovirus 25
Figure 4: Cycle de réplication des entérovirus. 27
Figure 5: Clivages protéolytiques post-traductionnels permettant la maturation de la polyprotéine. 31
Figure 6: Synthèse des brins d'ARN anti-génomiques et génomiques. 33
Figure 7: Mécanismes de recombinaison des entérovirus 36
Figure 8: Pathologies humaines et entérovirus. 41
Figure 9: Aspects microscopiques de myocardites aigues. 45
Figure 10: Analyses immunohistochimiques. 46
Figure 11: Trois phases immunopathologiques de la myocardite virale.(10) 49
Figure 12: Tranche biventriculaire montrant l'importante dilatation des ventricules 50
Figure 13: Représentation schématique de la physiopathologie de la myocardite et de la cardiomyopathie dilatée.(136) 53
Figure 14: Stratégies thérapeutiques dans les myocardites aigues.(191) 54
Figure 15: Représentation schématique de l'évolution d'une pancréatite aigüe avec hyperglycémie transitoire vers un diabète.(198) 56
Figure 16 : Pathogénèse de l'infection des cellules β par un entérovirus (EV) et du diabète de type 1 (T1D) 58
Figure 17: Représentation schématique d'une stratégie de prévention et thérapeutique dans le diabète de type 1 induit par l'infection par entérovirus.(219) 60
Figure 18: Pathogénèse de la myocardite aigue, subaiguë et chronique à entérovirus 62
Figure 19: Les voies de signalisations des TLR impliquées dans la réponse antivirale. 64
Figure 20: Représentation schématique des structures des RIG-I Like Receptors (RLR) et leur adaptateur MAVS. 66
Figure 21: La voie de signalisation RIG-I / MDA5. 68

Figure 22: Les différents types d'interférons et leur voie de signalisation. 69
Figure 23: Production d'interféron au cours d'une infection. 70
Figure 24: Rôle des IFN-1 au cours de l'infection virale.(248) 71
Figure 25: Schématisation des stratégies d'évasion des entérovirus dans les voies de signalisation cellulaires. 75
Figure 26: Représentation schématique des intéractions entre quasi-espèces virales (118)**.** 84
Figure 27 : Schéma illustrant l'hypothèse de mon projet de mobilité - post-doctorat, financé par la Fédération Française de Cardiologie 186

Liste des tableaux

Tableau 1: Récepteurs cellulaires des entérovirus..... 28

Tableau 2 : Propriétés et fonctions des protéines virales des entérovirus..... 30

Tableau 3:Facteurs cellulaires et viraux impliqués dans la réplication génomique des entérovirus..... 32

Tableau 4 : Principales causes des myocardites(147)**.**..... 45

Tableau 5: Intéractions entre les protéines virales et les effecteurs des voies de signalisation de la réponse immunitaire..... 76

Liste des abréviations

3D^{pol} : 3D polymérase

3'NC : 3'non codante

5'NC : 5' non codante

BEM : biopsie endomyocardique

CAR : *Coxsackie and Adenovirus receptor*

CD : Cluster de différenciation

CMD : cardiomyopathie dilatée

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

Cres : *Cis-active RNA elements*

CRP : *C réactive protéine*

CV : virus Coxsackie

CVB-TD : virus Coxsackie du groupe B tronqué en region 5'non codante

DAF : *Decay Accelerating Factor*

DT1 : Diabète de type 1

ECG : électrocardiogramme

ECP : effet cytopathogène

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

EV : Entérovirus

EV-B : Entérovirus du groupe B

EVB-TD : Entérovirus du groupe B tronqué en région 5'non codante

FEVG : fraction d'éjection du Ventricule Gauche

GAD65 : *Glutamic acid decarboxylase 65*

GALT : tissu lymphoïde associé aux intestins

HCM : *human cardiomyocytes*

HHV6 : Human Herpes Virus 6

hnRNP-C : *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C*

IA-2 : *islet antigen 2*

IFN-β : Interféron β

IL6 : Interleukine 6

IL10 : Interleukine 10

INS-1-E1 : *Rat insulinoma cell line*

IRES : *Internal Ribosome Entry Site*

IRM : imagerie par résonance magnétique

ISG : *Interferon-stimulated gene*

MAE : myocardite auto-immune expérimentale

MDA5 : *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*

MCP1 : *Monocyte chemoattractant protein 1*

NGS : séquençage de nouvelle génération

MSC : mort subite cardiaque

NK : *Natural Killer*

PABP : *poly(A)-binding proteins*

PC2 : Pro-Hormone convertase 2

PCBP : *poly (C)-binding proteins*

PCSK2 : *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 2*

PVB19 : Parvovirus B19

RACE PCR : amplification rapide des terminaisons de l'ADN complémentaire

RIG-I : *retinoic acid-inducible gene-1*

RLR : *RIG-I-like receptors*

SG : granule de stress

SOCS 3 : *Suppressor of cytokine signaling*

TD : *terminally deleted*

Th1 *: T helper 1*

Th2 : *T helper 2*

TNFα : *Tumor Necrosis Factor Alpha*

TLR: *Toll-like receptor*

VP 1-4 : *Viral protein 1-4*

VPg : *Viral Protein genome-linked*

INTRODUCTION

Le genre *Enterovirus* est constitué de virus à ARN appartenant à 15 espèces (entérovirus A à L et rhinovirus A à C) (1–7).

Les espèces d'entérovirus (EV-A à D) sont responsables d'environ un milliard d'infections chez l'Homme par an dans le monde (5). Quatre-vingt-dix pour cent de ces infections sont asymptomatiques ou bénignes (herpangines, éruptions cutanées, conjonctivites, pharyngites) (8) ; les autres sont responsables de pathologies sévères (sepsis néonataux, myocardites, méningites, pneumonies, pancréatites…) et de morts subites (8–10).

Certaines de ces infections évoluent vers des pathologies chroniques (cardiomyopathies dilatées, diabète de type 1) (8,11–18).

Les expressions cliniques dépendent de la charge virale, de l'organe cible, notamment de son système immunitaire, et de la variabilité génétique (13, 16, 17).

Des formes ARN d'EV tronqués dans la région 5' terminale non codante (5'NC), ont été détectées dans des cas de myocardite aigue, de pancréatite, ainsi que dans des cardiomyopathies dilatées chroniques et dans le diabète de type 1 (19–23). Ces données suggèrent que ces formes ARN tronqués seraient faiblement réplicatives et associées à la persistance virale (20,24,25). En 2019, nous avons montré par séquençage haut débit (NGS) que les populations virales persistantes dans des explants cardiaques de cardiomyopathie dilatée chronique étaient composées d'une majorité de formes virales tronquées en région 5'NC (95%) par rapport aux formes complètes (24). Ces formes virales étaient associées à une activité de la protéinase virale 2A, capable de cliver le facteur de traduction cellulaire eIF4G (facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4G) ainsi que la dystrophine des cardiomyocytes humains (24). Des populations d'EV du groupe B tronqués en région 5'NC (EVB-TD) ont également été détectées dans le pancréas de souris au stade chronique de l'infection sans effet cytopathique détectable par des tests de culture (21). Ces études suggèrent que ces formes d'EVB-TD pourraient être générées et sélectionnées précocement au cours de l'évolution naturelle de l'infection aigue. L'émergence de ces populations d'EVB-TD faiblement réplicatives pourrait expliquer la persistance du virus dans les tissus longtemps après l'infection aiguë conduisant à des pathologies chroniques.

Cette émergence précoce de formes majoritaires et réplicatives d'EVB-TD modulerait l'activation de la voie IFN-1, favorisant le développement d'une infection persistante (19).

Toutefois, la pathogenèse de ces pathologies n'est pas élucidée, limitant la prévention et les voies thérapeutiques. Il est donc important de développer la recherche expérimentale afin d'étudier l'impact des ARN génomiques des EVB-TD sur la modulation de la réponse IFN-1 et sur le développement de l'infection vers les cardiomyopathies dilatées chroniques et le diabète de type 1.

Dans la partie bibliographique, je présente les données sur les EV et leur pathogénicité, puis je présente nos travaux expérimentaux qui ont eu pour objectifs :

1- Déterminer la dynamique d'émergence des populations de virus Coxsackie-B3 tronquées dans le domaine I de l'ARN génomique et leur impact sur le profil de la réponse inflammatoire et les lésions histologiques dans les organes cibles chez la souris ;

2- Déterminer le rôle des populations d'EV-B tronquées en région 5'NC sur le métabolisme insulinique chez la souris DBA/2J et dans la cellule bêta pancréatique de rongeur.

3- Déterminer le rôle des populations d'EV-B tronquées en région 5'NC sur la réponse IFN-1 chez la souris DBA/2J et dans la cellule cible cardiaque humaine.

Ces travaux ont fait l'objet des articles principaux analysés dans ma thèse.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Entérovirus

A. Taxonomie

Le genre *Enterovirus* appartient à la famille des *Picornaviridae,* dans l'ordre des *Picornavirales* (26). Etymologiquement, *« picorna »* est issu du grec ancien « *πικο [piko]* » signifiant petit, et de « *RNA* », *ribonucleicacid*. *« Pico »* est également l'acronyme de « *Polio, Insensitive to ether, Coxsackie andOrphan* ». Les virus appartenant à cet ordre infectent les cellules eucaryotes et partagent des propriétés communes : (1) un ARN génomique simple brin de polarité positive liée de façon covalente à une protéine VPg (*Viral Proteingenome-linked*) à l'extrémité 5' et avec une queue poly-adénylée en 3' ; (2) une traduction génomique par clivage auto-protéolytique de la polyprotéine virale ; (3) une capside protéique icosaédrique non enveloppée ayant une symétrie en pseudo-T , (4) un module de trois domaines contenant une hélicase, une cystéine-protéinase et une ARN polymérase ARN-dépendante (26–28).

Le genre *Enterovirus* regroupe 15 espèces dont 7 sont pathogènes chez l'Homme : les espèces d'entérovirus (EV)-A, B, C et D et les rhinovirus A, B et C (**Figure 1**) (1,3,26,28,29). Les virus Coxsackies appartiennent aux espèces d'EV-A, B ou C (26).

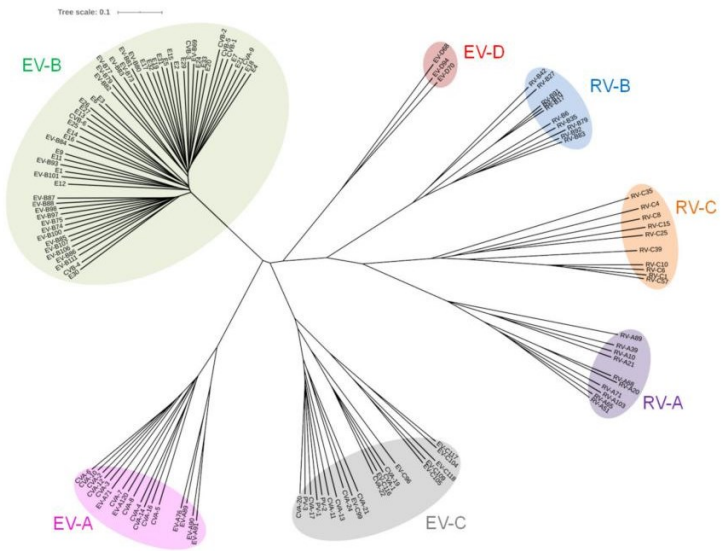


Figure 1: Arbre phylogénétique des entérovirus

L'arbre phylogénétique a été synthétisé à partir de la méthode Maximum Likelihood, à partir des génomes complets des espèces d'entérovirus (EV A à D) et rhinovirus (RV A à C) (30,31).

B. Structure

1. Virion

Les EV sont des virus non enveloppés d'un diamètre de 30 nm. Cette absence d'enveloppe lipidique est associée à une résistance à l'inactivation par l'éther. Ils conservent leur pouvoir infectieux plusieurs années à -80°C, quelques semaines à 4°C et quelques jours à température ambiante. Ils sont inactivés par les rayons ultraviolets, les oxydants (hydrochlorite de sodium), le formol et la bêta-propiolactone. L'élément le plus externe du virion est sa capside icosaédrique protégeant l'ARN viral simple brin nu (32,33).

Cette capside est composée de l'assemblage d'une douzaine de pentamères (**Figure 2A**) composés chacun de cinq protomères par l'assemblage des quatre protéines virales structurales : VP (*Viral Protein*) 1 à 4 (**Figure 2A et B**) (33). L'extrémité carboxy-terminale des VP1, VP2 et VP3 est localisée sur la surface de la capside virale tandis que l'extrémité amino-terminale se situe à l'intérieur contribuant à la stabilité du virion. La protéine VP4 se situe à l'intérieur de la capside. Un réseau d'interactions protéines-protéines des VP1 à VP4 maintient une structure icosaédrique, irrégulière avec des élévations et des dépressions appelées canyons (**Figure 2B**). Un canyon est une zone d'importance dans la fonction de la capside virale car il permet la fixation du virion à son récepteur cellulaire, par des séquences d'acides aminés hyper-conservées dans des poches hydrophobes (33,34). Les berges d'un canyon possèdent des structures variables favorisant un échappement à la reconnaissance par les anticorps neutralisants (33,34).

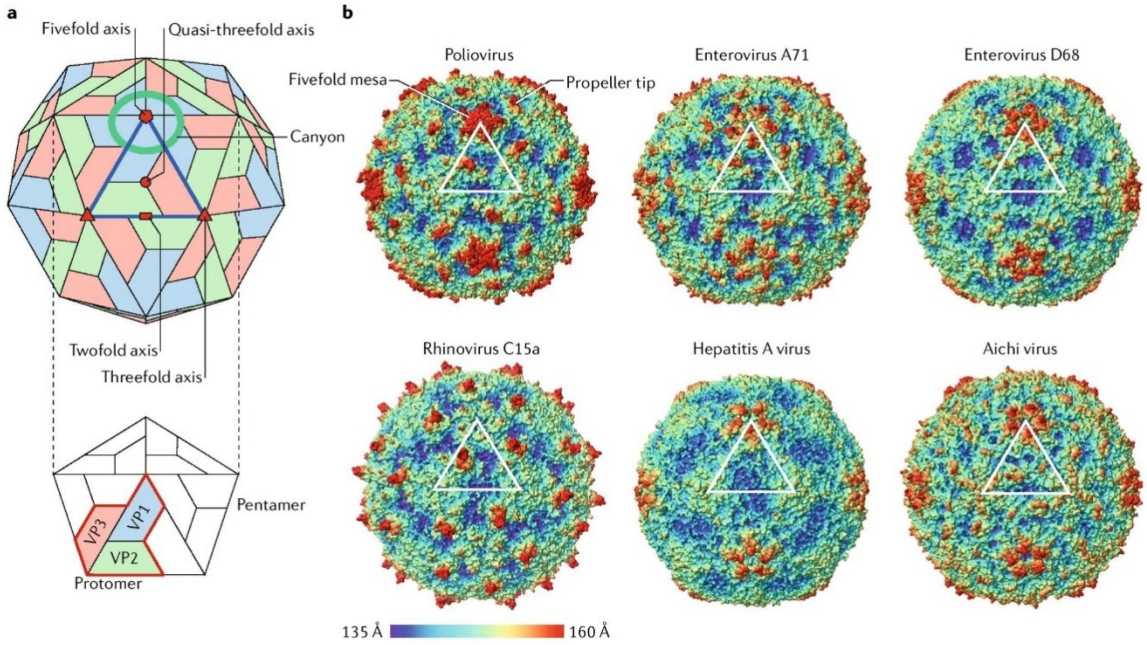


Figure 2: Morphologie des virions des entérovirus.

A. Représentation schématique d'un pentamère composé de 5 protomères formés par l'assemblage des protéines structurales de surface VP1, VP2 et VP3 et de la protéine interne VP4. B. Surface capsidique de sixEV 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 représentée en bleue.(35)

La **figure 2B** illustre la morphologie unique de chaque EV, du fait de séquences en acides aminés propres, qui sont la conséquence de mutation et de recombinaison. 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 sont situées dans le coude de connexion des feuillets-β et dans les séquences en acides aminés des extrémités amino et carboxy-terminales.

La variabilité structurale relative a des répercussions sur la stabilité physico-chimique et la transmissibilité. Par exemple, les Rhinovirus transmis par voie respiratoire sont sensibles à un pH inférieur à 6 alors que les autres EV transmis par voie oro-fécale sont plus résistants dans l'environnement et le tube digestif car stables à un pH inférieur à 3.

Cette variabilité structurale a également des conséquences en terme d'antigénicité. L'antigénicité (permettant d'identifier un sérotype viral) est liée sur le plan moléculaire aux extrémités carboxy-terminales des protéines VP1, VP2 et VP3 ainsi qu'aux différentes boucles connectant les protéines de la capside à la surface extérieure du virion. Le sérotypage qui servait à classer les différents EV selon leur antigénicité propre a été remplacé par une classification par biologie moléculaire (séquençage de l'ARN génomique) (**Figure 1**).

2. ARN génomique

L'ARN de polarité positive des EV est traduit directement par les ribosomes cellulaires, permettant la synthèse de protéines virales nécessaire à sa propre réplication. Sa longueur moyenne est de 7 500 nucléotides (28,35). Il contient un cadre de lecture principal permettant la traduction de l'ARN viral codant sous forme de poly-protéine, maturée secondairement en protéines virales fonctionnelles (28,35). La poly-protéine est autoclivée par les protéinases en 11 protéines virales (36). La nomenclature actuelle divise la région codante de l'ARN viral en 3 parties : P1, P2 et P3 (**Figure 3A**) (37). La région génomique P1 code pour des protéines virales structurales VP1 à VP4 formant la capside virale tandis que les régions P2 et P3 codent pour des protéines permettant la maturation et le clivage de la poly-protéine (protéases 2A et 3C et la protéine 3CD) ou la réplication du génome viral (protéines 2B, 2C, 3AB, VPg, 3CD et la polymérase 3D) (32,37). Les genres *Aphthovirus* et *Cardiovirus* parmi les *Picornaviridae* possèdent une quatrième région en amont de la région P1 qui code pour une douzième protéine nommée protéine Leader L. Un second cadre de lecture a été récemment décrit, permettant la synthèse d'une protéine ORF2p ayant un rôle dans la virulence et le tropisme pour les cellules intestinales (38).

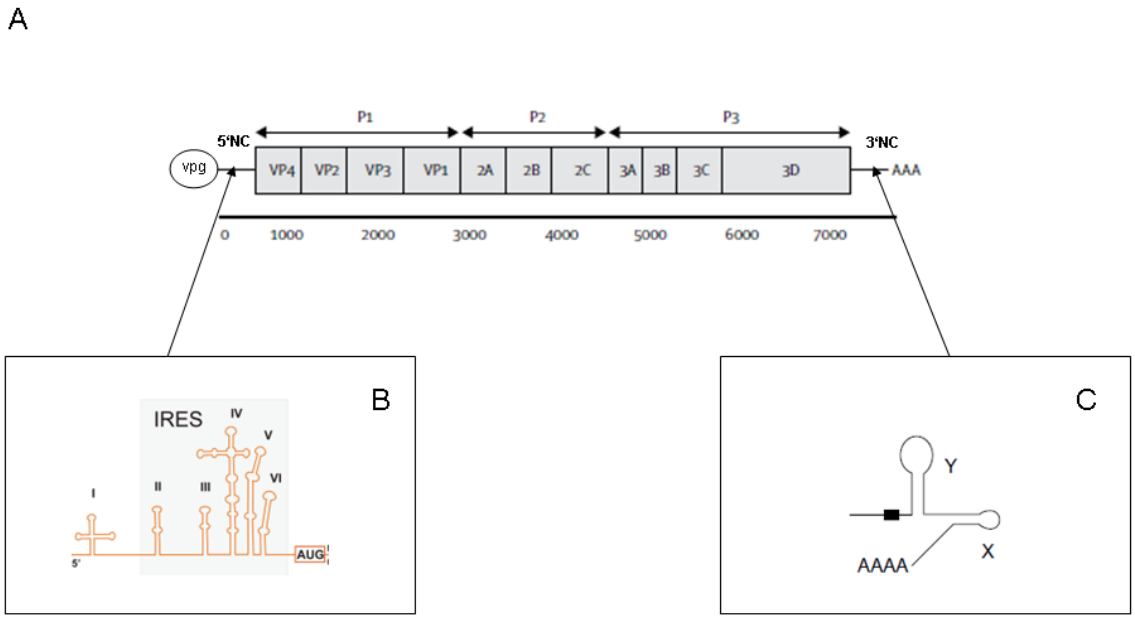


Figure 3: ARN génomique des entérovirus

A. 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 B. en 5' et C. en 3' impliquées dans la régulation de la réplication et de la traduction. La région codante code des protéines structurales (4 protéines de capsides de VP1 à VP4) et des protéines non-structurales (protéases et polymérase virales). NC : non-codante ; IRES, Internal Ribosome Entry Site ; AAAA queue polyadénylée. (37)

Le génome des EV forme une liaison covalente O4'-(5'-uridylyl)-tyrosine entre la région 5' non codante (5'NC) et la tyrosine en 3ème position de la protéine VPg (*Viral Proteingenomelinked*, appelée également protéine 3B sur le génome viral ; Figure 11A) (39). La VPg varie en taille de 19 à 26 acides aminés et n'est pas présente sur les ARNm (ARN messagers) viraux associés aux ribosomes cellulaires, en cours de traduction (39,40). Les ARNm viraux diffèrent des ARN viraux par l'absence d'une liaison de la VPg à l'extrémité 5'NC(35). Cette protéine VPg est une protéine importante dans la réplication 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 (32,35,39,40).

La région 5'NC est un segment génomique hautement conservé parmi les EV [**Annexe 4**] (31). Sa longueur varie de 624 à 1199 nucléotides et elle est composée de structures fonctionnelles permettant le contrôle de la transcription, de la réplication et de la traduction virales. La première structure (I) en feuille de trèfle est composée de 4 tige-boucles nommées a, b, c et d. Les six structures suivantes (II à VII) composent l'*Internal Ribosome Entry Site* (IRES) (**Figure 3B**). Le domaine IRES est une structure impliquée dans la fixation de

ribosomes cellulaires et dans la traduction directe de l'ARN génomique viral. Des mutations nucléotidiques mineures entre les structures V et VI peuvent avoir un impact sur le tropisme cellulaire et la virulence des EV.

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 3C**) (31,37). Cette région se termine par une queue polyadénylée 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. La polyadénylation de la région 3'NC semble essentielle pour maintenir la réplication des EV (31,32,35).

Enfin, des structures *Cis-active RNA elements*(Cres) sont présentes sur différentes régions du génome viral (41,42). Il s'agit d'éléments constitués d'une tige-boucle d'environ 61 nucléotides permettant la liaison covalente de la VPg et l'initiation de la transcription après fixation de l'ARN polymérase ARN-dépendante (3D polymérase) par uridylylation de la VPg (41,42).

C. Cycle de réplication virale

La réplication des EV a lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte (35). Après l'attachement du virus à un récepteur cellulaire, l'ARN génomique viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule par décapsidation. L'ARN viral de polarité positive est directement traduit dans le cytoplasme et permet la synthèse de protéines nécessaires à sa réplication génomique et à la production de nouveaux virions (35).

Après traduction des protéines virales, la première étape de la réplication est la transcription de l'ARN de polarité positive par la 3D polymérase ($3D^{pol}$) en un ARN de polarité négative (aussi appelé antigénomique ou intermédiaire de réplication). Le brin d'ARN antigénomique sert 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'ARN viral peut être encapsidé. Le précurseur de protéines

structurales P1 est clivé en protéines de capside qui s'assemblent en protomères immatures : VP1-VP3-VP0. Ces derniers, 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'EV de la cellule hôte provoque la lyse cellulaire par perte de l'intégrité de la membrane (**Figure 4**) (35,43). Les virions peuvent être également être libérés sous forme de vésicule extracellulaire, sans lyse cellulaire (35).

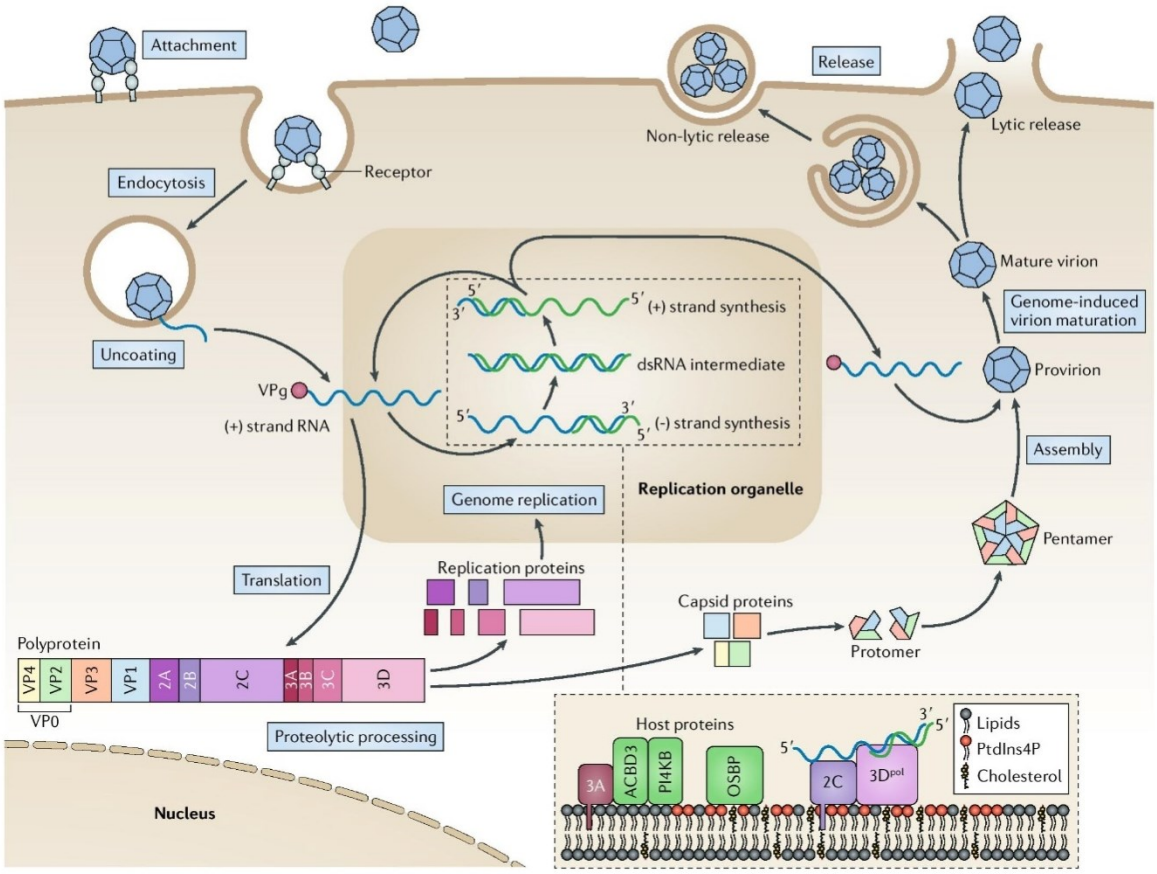


Figure 4: Cycle de réplication des entérovirus.

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. 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. Le brin d'ARN néosynthétisé de polarité négative sert ensuite de brin matrice pour la synthèse d'autres brins d'ARN de polarité positive, en passant par une forme réplicative double brin. L'assemblage de la capside à partir des protéines structurales autour de l'ARN positif permet la synthèse d'un virion infectieux. Les virions matures sont libérés soit par lyse cellulaire, soit dans des vésicules extracellulaires non-lytiques (35).

1. Attachement sur le récepteur

L'infection par un EV débute par l'attachement du virus à la membrane d'une cellule permissive possédant les récepteurs spécifiques (35,44–46). Il s'agit d'une liaison protéine-protéine entre un canyon de la capside de l'EV et le récepteur membranaire présent à la surface de la cellule hôte (34). Un seul récepteur membranaire est requis pour certains EV (poliovirus et rhinovirus) alors qu'un corécepteur est parfois requis pour d'autres EV. Les différents récepteurs d'entrée des EV dans la cellule hôte sont listés dans le **tableau 1**. La présence de ces récepteurs sur la membrane cellulaire rend les cellules permissives à l'infection, expliquant le tropisme des EV pour certains tissus.

Tableau 1: Récepteurs cellulaires des entérovirus

Virus	Récepteur	Rôle	Réf.
Poliovirus	PVR (CD155)	Décapsidation	(47)
EV-A71, CVA7, CVA14 et CVA16	SCARB2	Décapsidation	(48)
EV-A71-PB, CVA2, CVA7, CVA10, CVA14 et CVA16	PSGL1	Attachement	(49)
EV-A71	Annexine II, DC-SIGN, nucleoline et vimentine	Attachement	(50)
EV-A71 et E-5	Héparane sulfate	Attachement	(50,51)
EV-A71, EV-D70 et CVA24v EV-D68	Acide sialique	Attachement Décapsidation	(50,52,53)
EV-D68	ICAM5	Décapsidation	(54)
Rhinovirus (mineur)	LDLR, VLDLR et LRP	Attachement	(54)
Rhinovirus (majeur), CVA21 et CVA24	ICAM1	Décapsidation	(51,52,55)
Rhinovirus C	CDHR3		(56)

CVA21, CVB1, CVB3, CVB5, E-3, E-6, E-7, E-11, E-12, E-13, E-19, E-20, E-21, E-25, E-29 et E-30	DAF	Attachement	(51,57)
CVB1 - CVB6	CAR	Décapsidation	(58)
CVA9, E-1 et E-9	Integrine αvβ3	Attachement	(51,59)
E-1 et E-8	Integrine α2β1 (VLA2)	Attachement	(60)

CAR: coxsackievirus–adenovirus receptor; CDHR3: cadherin-related family member 3; CV: coxsackievirus; CVA24v, coxsackievirus A24 variant; DAF: complement decay-accelerating factor; DC-SIGN: dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin; E: echovirus; EV: enterovirus; EV-A71-PB: EV-A71-PSGL1-binder; ICAM: intercellular adhesion molecule; LDLR: low-density lipoprotein receptor; LRP: LDLR-related protein; PSGL: P-selectin glycoprotein ligand 1; PVR: poliovirus receptor; SCARB2: scavenger receptor class B member 2; Sia: sialic acid; VLA2: very late antigen 2; VLDLR: very low-density lipoprotein receptor.

Certains récepteurs sont communs à plusieurs virus, comme le récepteur CAR, commun aux virus Coxsackies et aux adénovirus (58). En fonction des EV, différents mécanismes d'endocytose sont utilisés (clathrine dépendante, cavéoline dépendante ou non) (35,61,62).

2. Traduction de l'ARN viral

Étant dépourvu de protéine virale préformée dans sa capside, l'ARN viral de polarité positive des EV doit être nécessairement traduit dans le cytosol pour poursuivre son cycle de réplication (35). La protéine VPg liée de manière covalente à son extrémité 5'NC est clivée par des protéases cellulaires. L'ARN génomique est alors traduit comme un ARNm par fixation de l'IRES située en 5'NC à la sous-unité ribosomique 40S (31,35).

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 2α* (eIF2α), eIF3 et eIF4G 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) (32,63).

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 (35). La polyprotéine est

le précurseur de toutes les protéines virales (**Tableau 2**) et elle sera maturée en protéines fonctionnelles par des clivages protéolytiques post-traductionnels (35). Le premier clivage s'effectue 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 effectués par les protéases virales : 2A, le précurseur 3CD ou la protéase 3C (**Figure 5**).

Tableau 2 : Propriétés et fonctions des protéines virales des entérovirus.

Protéine	Propriétés Domaines	Fonctions	Réf.
VP4	70 AA / 7,3kDa	Protéine de la capside virale, localisé entièrement à l'intérieur de la surface interne de la capside.	(28)
VP2	256 AA / 28,6kDa	Protéine de la capside virale	(28)
VP3	231 AA / 25,1kDa	Protéine de la capside virale,	(28)
VP1	277 AA / 30,5kDa	Protéine de la capside virale, interagit avec les récepteurs cellulaires du virus.	(28)
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	(35,64)
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	(65)
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.	(66,67)
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.	(68)
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.	(69)
3C	205 AA / 21,6kDa	Protéase virale, permet la maturation de la polyprotéine virale.	(33)

	Cystéine Protéase		
3D	460 AA / 51,9kDa ARN polymérase	ARN polymérase ARN dépendante permettant la réplication des ARN viraux de polarité positive et négative.	(70)
ORF2p	64-76 AA /	Modulation de la virulence au niveau des cellules intestinales.	(38)

AA acides aminés, kDa kiloDalton

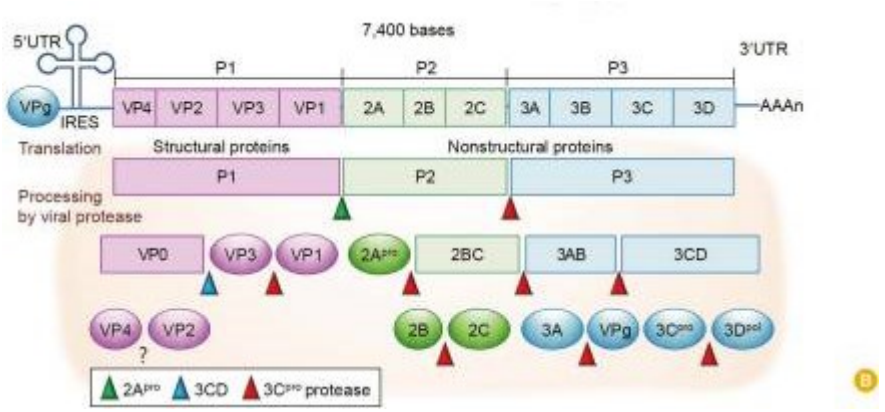


Figure 5: Clivages protéolytiques post-traductionnels permettant la maturation de la polyprotéine.

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 par la protéase 2A (2Apro), la protéase 3C (3Cpro) ou leur précurseur (3CD).(71)

La polyprotéine virale est directement clivée dès que les séquences codant les protéases virales sont traduites (35,36). Le clivage dans la région P1 entre la VP4 et VP2 n'est effectué que lors de l'encapsidation de l'ARN génomique viral. Les protéases 2A et 3C virales sont libérées de la polyprotéine environ deux heures après l'entrée de l'ARN viral dans le cytoplasme, entraînant une inhibition de la traduction des protéines cellulaires (« *shut-off* » cellulaire), notamment par le clivage de facteurs d'initiation de la traduction tels que eIF4A1, PABP et eIF4G (35,36).

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, désorganisés par l'infection à EV. Les protéines virales, notamment la protéine 2C, interagissent avec le facteur cellulaire *reticulon 3,*

et participent à la formation de vésicules cytoplasmiques à double membranes (organelles de réplication), siège de la réplication virale du fait d'un environnement favorable au recrutement de facteurs cellulaires (28,35,37,39).

L'ARN-polymérase ARN-dépendante nécessaire à la réplication est la $3D^{pol}$. Il s'agit d'une protéine de 52kDa qui ressemble au niveau structural à une main droite avec des domaines paumes (site catalytique) et des domaines pouces et doigts en opposition, encerclant le site catalytique (70,72,73). La $3D^{pol}$ est une polymérase de basse fidélité comme toutes les polymérases des virus à ARN, à l'origine de mutations aléatoires (70). La $3D^{pol}$ nécessite des facteurs cellulaires, telles que les *poly (C)-binding proteins* (PCBP) et *poly(A)-binding proteins*(PABP) pour former un complexe de réplication de l'ARN (**Tableau 3**) (70).

Tableau 3:Facteurs cellulaires et viraux impliqués dans la réplication génomique des entérovirus

Protéine	Intéractions	Fonctions	Réf.
PCBP 1	Domaine-I tige-boucle "*b*"	Initiation de la traduction virale et de la synthèse d'ARN	(74–76)
PCBP 2	Domaine-I tige boucle "b", Région riche en Carbone (C) & Domaine-IV (IRES)	Initiation de la traduction virale et de la synthèse d'ARN. Passage de la traduction virale à la réplication virale génomique	(75,77–80)
EF-1α	Domaine- I	Candidat cofacteur de la réplication du génome des entérovirus	(81)
La	5'NC, domaine-I, IRES & 3'NC	Le complexe 5'NC-La / La-3'NC peut former une boucle de réplication et initier la réplication virale. Cofacteur du complexe protéine-ARN d'initiation de la pré-traduction	(82,83)
hnRNP K	Domaines-I à II & Domaine-IV (IRES) & 5'NC biotinylé des EV71	Inhibition de la synthèses d'ARN viral	(32,84)
hnRNP A1 & A2	Domaines-II à II & Domaine-VI (IRES)	Activation de l'IRES / régulation de l'épissage alternatif, et antagonise l'activité des protéines riches en sérine-arginine (SR)	(85,86)
hnRNP C	Extrémité 3' des brins négatifs & domaine-I	Augmente la synthèse d'ARN viral	(87,88)
PABP	Domaine-I tige-boucle "b"	Augmente la traduction médiée par l'IRES et la synthèse d'ARN	(89–91)
3AB	Domaine-I tige-boucle "b"	Augmente la traduction médiée par l'IRES et la synthèse d'ARN	(92)
3CDpro	Domaine-I tige-boucle "d"	Diminution de la traduction virale et augmentation de la synthèse d'ARN brin négatif	(93–98)
3Cpro	Domaine-I tige-boucle "b" ou "d"	Initiation de la traduction virale et de la synthèse d'ARN	(74,93,99,100)
A3G	Domaine-I et tige-boucle IV (IRES)	Inhibition de la synthèses d'ARN viral	(101)
TRIM7	Protéine 2BC	Inhibition de la traduction virale et de la synthèse d'ARN	(102)
AUF1	5'NC	Inhibition de la traduction virale et de la synthèse d'ARN	(103)

FBP2	Domaines I à III, le domaine V-VI et la région liaison du 5'NC des EV71	Inhibition de la synthèse des protéines virales	(86)
FBP1	Uniquement la région de liaison (637 à 745nt) de la région 5'NC des EV71	Augmente la synthèse des protéines virales	(86)

Les PCBP cellulaires se fixent sur la boucle *b* de la structure en feuille de trèfle de la région 5'NC des EV (75,93). La fixation des PABP aux PCBP par interaction protéine-protéine, permet ensuite le repliement de l'ARN viral par la fixation de la queue Poly(A) (l'extrémité de la région 3'NC) aux PABP (91). Cette boucle stabilisant la structure tertiaire du complexe de réplication permet l'interaction de la pré-protéine virale 3CD avec la boucle *d* de la structure en feuille de trèfle (**Figure 6A**) (81,100). La $3D^{pol}$ exerce son activité d'ARN-polymérase ARN-dépendante en utilisant la protéine VPg comme amorce et synthétise le brin d'ARN de polarité négative (39,40). Des formes libres simple brin d'ARN antigénomiques n'ont jamais été observées dans une cellule infectée, ce brin servant de matrice à la synthèse d'autres ARN de polarité positive.

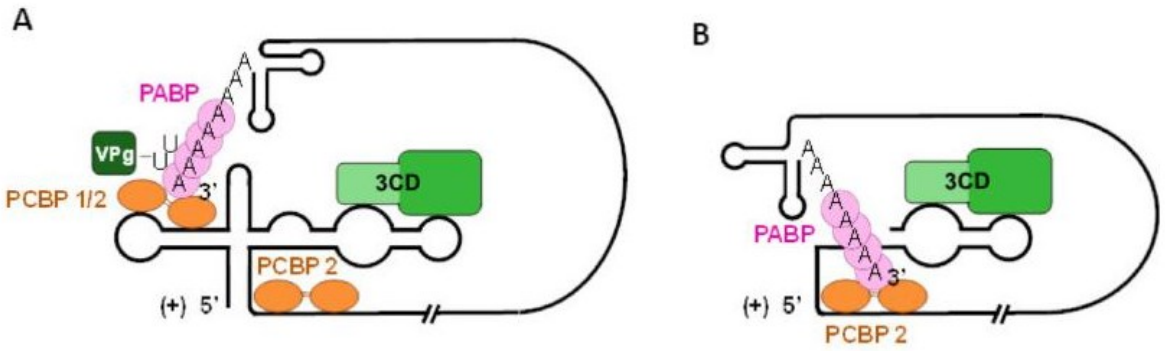


Figure 6: Synthèse des brins d'ARN anti-génomiques et génomiques.

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 : heterogeneousnuclearribonucleoprotein (dont font partie les PABP et PCBP).(31)

La transcription des ARN antigénomiques en ARN de polarité positive se fait de façon similaire grâce à 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 6B**) (89). La synthèse des ARN viraux

est asymétrique, la production des brins d'ARN génomique est de 30 à 70 fois plus importante que la synthèse des ARN antigénomiques (104).

4. Assemblage et libération du virion

La réplication virale produit une grande quantité de brins d'ARN génomiques pour la synthèse de protéines virales, dont le précurseur protéique de la capside : P1. P1 est clivé par la protéase virale 3C et son précurseur en trois protéines : VP1, VP3 et VP0 (**Figure 3**) (35,105). Un premier assemblage intermédiaire immature s'établit par la formation d'un complexe de ces protéines virales VP0, VP1 et VP3 en un protomère 5S (S : 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 capside 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 et stable (33,35). Aucune protéase n'a été identifiée pour expliquer le clivage de VP0 en VP4 et VP2 et un rôle autocatalytique dépendant de l'ARN viral est suspecté.

Le processus d'encapsidation du génome des EV est spécifique, permettant l'incorporation de l'ARN viral de polarité positive (et rarement négative) dans la capside et non des ARNm viraux ou cellulaires. 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 antigénomique non détecté à l'intérieur de virions matures. L'encapsidation serait plutôt dépendante de l'activité de réplication virale, aucun signal d'encapsidation spécifique du brin de polarité positive n'ayant été identifié à ce jour (25,33,108).

La libération des virions matures intracytoplasmiques à l'extérieur de la cellule se fait surtout par lyse de la cellule infectée, mais également par fusion de vacuoles autophagiques avec la membrane cellulaire (vésicules extracellulaires) (35).

D. Évolution et adaptation cellulaire

1. Mutations/Recombinaisons

Outre les mutations spontanées générées par la faible fidélité de la $3D^{pol}$ à chaque cycle de réplication, des phénomènes de recombinaison contribuent à la genèse de séquences différentes d'ARN d'EV(109). Les populations d'EV présentent une grande variabilité génétique, à l'origine d'une grande capacité d'adaptation sous la pression de sélection (70,110,111). La diversification du génome des EV peut affecter la virulence, le tropisme tissulaire, les barrières d'espèces inter-hôtes, et moduler la persistance virale à l'échelle d'une cellule comme d'une population (110,111). 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 (111).

Les mutations spontanées sont inhérentes à la basse fidélité de la $3D^{pol}$ et concernent surtout les protéines virales de surface de la capside VP1, VP2 et VP3, exposées à l'environnement où l'on note jusqu'à 25% de variations nucléotidiques, alors que la protéine VP4 et les protéines non structurales présentent des variations nucléotidiques nettement moindres (70). 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). À l'inverse, une mutation aléatoire sur une protéine virale de la capside VP1, VP2 et VP3 peut entraîner un changement structurel modifiant les capacités de virulence et donc de réplication virale (« *fitness* » virale). Du fait du modèle d'évolution génétique des EV s'appuyant sur la notion de pression de sélection, une souche d'EV mutante peut 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* » virale plus faible (110,111). Cette diversité génétique est fondamentale pour l'adaptation des EV. À 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 (112).

La recombinaison génétique virale est une deuxième stratégie pour moduler la diversité génétique des EV. Il est extrêmement courant chez les *Picornaviridae* bien que différent de celui décrit dans le système eucaryote (109). 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 de capside. Deux mécanismes de recombinaison existent de manière non exclusive pour les EV : le mécanisme réplicatif (ou modèle « *copy choice* ») et le mécanisme non réplicatif (« *breakage-joining* ») (109,113,114).

Dans le mécanisme réplicatif, la recombinaison repose sur la translocation de la polymérase 3D d'un brin d'ARN vers un autre brin d'ARN pendant la réplication virale, produisant un génome chimérique qui contiendra les fragments des deux brins parentaux (**Figure 7A**). Dans le mécanisme non réplicatif, l'ARN viral ou même cellulaire est fragmenté du fait de contraintes physiques, de l'activité d'endoribonucléases cellulaires, de ribozymes, par autocatalyse (**Figure 7B**). Ces fragments vont se lier entre eux par trans-estérification, ou par réparation enzymatique grâce aux ligases cellulaires, en cas d'extrémités compatibles (109). Il en résulte la formation d'un génome viral chimérique.

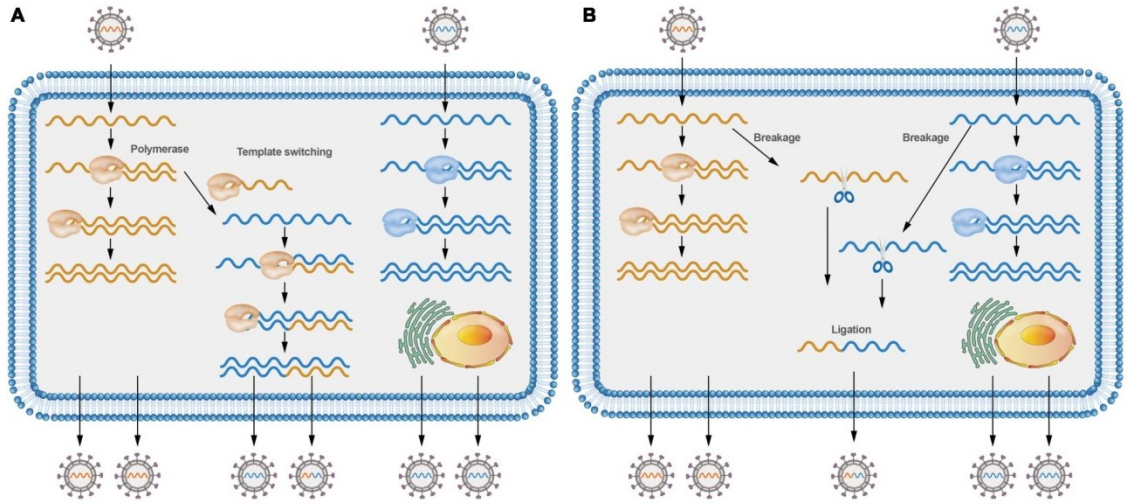


Figure 7: Mécanismes de recombinaison des entérovirus

A. La recombinaison réplicative correspond à une dissociation du brin d'ARN néosynthétisé au brin matrice lors de l'étape de réplication génomique de l'ARN viral par la polymérase virale. La polymérase se détache alors du brin matrice et s'associe à un nouveau brin d'ARN. La synthèse du brin néosynthétisé continue suivant le nouveau brin matrice induisant la synthèse d'un génome chimérique. B. La recombinaison non réplicative se produit lors de la fragmentation du génome par des activités enzymatiques ou des lésions physicochimiques. Ces fragments génomiques peuvent être réparés par ligation autocatalytique ou par des ligases cellulaires, qui aboutissent à un génome chimérique. (115)

Les deux mécanismes présentés dans la **figure 7** peuvent générer des recombinaisons, homologues ou non homologues (113–117). La recombinaison homologue se produit dans le

même site de l'ARN viral pour les deux brins parentaux. Cette recombinaison génère un génome recombinant possédant l'exacte structure génétique des souches parentales qui ont un haut taux d'homologie de séquence. À l'inverse, la recombinaison non homologue a lieu dans des sites et structures différentes pour les deux brins d'ARN 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.

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, dont le concept a été déjà décrit pour beaucoup de virus à ARN (111). Cette hétérogénéité des populations virales trouve son origine dans les mutations spontanées et dans les événements de recombinaison, conséquence de l'activité de réplication des ARN viraux. Cette multitude de variants ou quasi-espèces virales proches génétiquement mais non identiques constitue un réservoir de variations génétiques délétères, neutres, ou bénéfiques en fonction de l'environnement (110). Elle constitue un réservoir en termes d'adaptabilité ou de plasticité des EV (échappement 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 (110). Ce réservoir est dépendant de la réplication virale. L'évolution des quasi-espèces dans un environnement non évolutif pourrait être mathématiquement prédite (118). Cependant, des récentes données obtenues par des approches de séquençage de nouvelle génération (NGS) ont démontré que des quasi-espèces minoritaires à « *fitness* » faible dont on prédisait mathématiquement la disparition sont encore détectables à très bas niveau (25,111).

II. Infections par Entérovirus chez l'Homme

A. Épidémiologie

Les espèces EV-A à D sont responsables d'environ un milliard d'infections chez l'Homme par an dans le monde (5). Quatre-vingt-dix pour cent de ces infections sont asymptomatiques ou bénignes (herpangines, éruptions cutanées, conjonctivites, pharyngites) (8) ; les autres sont responsables de pathologies sévères (sepsis néonataux, myocardites, méningites, pneumonies, pancréatites…) et de morts subites (8–10).

Certaines de ces infections peuvent évoluer vers des pathologies chroniques, cardiomyopathies chroniques (CMD), diabète de type 1 (DT1) (8,11–18).

Les EV-A à D sont transmis par voies oro-fécale, respiratoire et materno-fœtale (1,3,4,7,8).

Les EV évoluent sur un fond endémique avec des poussées épidémiques (1,3,4,7,8). On enregistre un plus grand nombre d'infections pendant l'été et au début de l'automne dans les pays à climat tempéré (1,3,4,7,8).

Les EV atteignent principalement l'enfant et l'adulte de moins de 20 ans et il existe une prépondérance masculine chez les moins de 20 ans (1,3,4,7,8).

Malgré l'augmentation du nombre de séquences disponibles d'EV isolées, notamment des séquences de la région VP1 (*Viral protein 1*), il n'existe pas de lien absolu entre un génotype donné et la survenue d'une épidémie (3,8). Le même génotype peut être endémique dans certains pays et épidémique dans d'autres. Il existe vraisemblablement d'autres facteurs que le génotype viral dans la genèse d'une épidémie, comme les déplacements des individus, le niveau d'hygiène, le climat et l'immunité préexistante dans la population humaine exposée.

B. Diagnostic virologique

Le diagnostic virologique direct a été basé sur la culture cellulaire, mais s'appuie désormais sur les techniques de PCR temps réel (RT-PCR) (7). Depuis les années 1990, une

meilleure connaissance de la structure du génome des EV a permis le développement des techniques de détection du génome viral au premier rang desquelles la « *Polymerase Chain Reaction* » (PCR) (7). L'essor de ces nouvelles techniques a permis l'amélioration des connaissances sur la physiopathologie des infections à EV mais surtout de faciliter le diagnostic des infections à EV. Elles permettent un diagnostic étiologique rapide (en moins de 48 h) des infections à EV quel que soit le type de prélèvement (7). Elles s'appuient sur l'amplification d'une région hyper-conservée à l'extrémité 5' non codante (5'NC) du virus, permettant ainsi la détection des 100 principaux sérotypes d'EV humains (7). C'est donc désormais une technique universelle, mais qui se décline en différentes variantes selon le type de sondes ou le mode de révélation du produit d'amplification. La PCR temps réel (RT-PCR) permet un traitement quantitatif du signal d'amplification sans manipulation supplémentaire. C'est une technique plus sensible que la culture cellulaire (entre 10 à 100 copies d'ARN génomique pour 200 µl de liquide biologique) et très spécifique (7). La caractérisation des souches amplifiées passe par le séquençage de régions variables des gènes des protéines de capside VP1 ou VP4/VP2 (7,119,120). Ces techniques permettent une identification génotypique des souches d'EV, qui remplacent complètement désormais le sérotypage par séroneutralisation. Cette technique de séquençage moléculaire est particulièrement utile dans le cadre d'études épidémiologiques et physiopathologiques notamment pour les EV non cultivables.

Le diagnostic virologique indirect repose sur la sérologie qui offre peu d'intérêt désormais lors du diagnostic d'une infection aiguë à EV (7). En effet, il existe des réactions croisées entre les différents sérotypes d'EV rencontrés par le patient durant toute sa vie et avec l'immunité vaccinale contre la poliomyélite induite par la vaccination obligatoire (7). L'interprétation des sérologies nécessitait une analyse de la cinétique des anticorps spécifiques des EV sur une période de 15 jours (7). Les deux techniques utilisées étaient la séroneutralisation et les techniques de type ELISA « *enzyme-linked immunosorbent assay* » (7,121). La séroneutraliation était une technique lourde reposant sur l'inhibition de l'entrée d'un sérotype d'EV connu dans les cellules permissives par le sérum du patient. Cette méthode était classiquement utilisée pour les poliovirus, les échovirus et les virus Coxsackies B. Les techniques ELISA ont été mises en place secondairement du fait d'une meilleure connaissance des structures antigéniques des protéines de capside des différents sérotypes d'EV. Néanmoins, même s'il existe des trousses commerciales permettant la détection des IgG, des IgM ou des IgA par ELISA pour la plupart des sérotypes d'EV, les réactions croisées précédemment décrites en limitent l'intérêt(7). Aujourd'hui le diagnostic indirect d'une infection à EV ne

présente aucun intérêt en pratique clinique courante mais il peut être intéressant dans des études séro-épidemiologiques.

Le diagnostic virologique direct reste donc à privilégier par détection moléculaire grâce à la PCR à partir de prélèvements, qu'ils proviennent des sites de réplication primaire, du sang (virémie) ou des organes cibles (7).

C. Pathogenèse

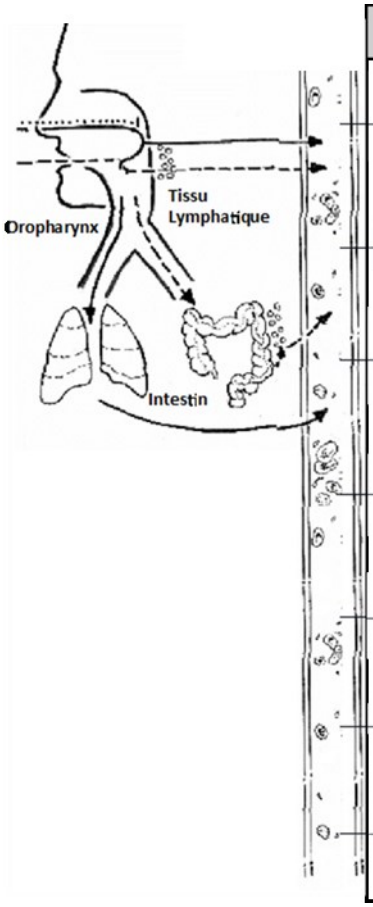
Les expressions cliniques dépendent de la charge virale, de l'organe cible, de la variabilité génétique et de l'immunité (13, 16, 17).

L'immunité innée puis l'immunité acquise ou adaptative sont nécessaires pour la clairance des EV (8). Les anticorps de type IgM sont présents pendant 7-10 jours, avant la sécrétion des IgG (10). Les anticorps neutralisants apparaissent approximativement à partir de la deuxième semaine d'infection avec un maximum 5 semaines après l'infection, avec parfois une sécrétion toute la vie (8,10). Les anticorps sont principalement dirigés contre l'antigène de la protéine virale 1 (VP1)(11,122–125). Une protection contre une réinfection par le même sérotype est souvent observée mais elle est limitée, avec des réinfections paucisymptomatiques (125). Les infections par différents sérotypes et les réponses hétérotypiques des anticorps aux EV (entre différents sérotypes) sont courantes (11,124,125).

1. Infections aigües

Après l'entrée par voie respiratoire ou orale, les EV infectent des cellules permissives au niveau de site de réplication primaire que sont les amygdales, les plaques de Peyer et le tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT), les EV étant résistant au pH acide de l'estomac (8). Une phase de virémie brève permet aux EV d'atteindre des organes cibles tels que le cœur, le pancréas, le foie, la peau, les muscles, le système nerveux central ou les poumons (**Figure 8**) (8,10). En particulier, la virémie est le premier temps des infections materno-fœtales (9). La

réplication des EV au sein du ou des organes cibles entraîne une deuxième virémie avant l'excrétion fécale du virus (8).



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

Figure 8: Pathologies humaines et entérovirus.

CV : virus Coxsackie ; EV : entérovirus. CMD: cardiomyopathie dilatée.(43)

Outre les atteintes cardiaque et pancréatique qui seront détaillées ci-dessous, les syndromes cliniques fréquents très évocateurs des EV sont les méningites et le syndrome pied-main-bouche (3,8,43). Il n'existe pas de corrélation absolue entre le tableau clinique et le génotype viral (8). Les rhinites, bronchites, bronchiolites, pneumonies sont plutôt la conséquence d'infection à virus Coxsackies A, B (CVA-B), échovirus, rhinovirus (HRV), EV-D68 (EV68), EV-A71 (EV71) et EV-C104 (8,43,126). Les infections des muscles striés squelettiques avec myosite sont plutôt la conséquence d'infection par des EV-B (15,127). Le cœur est principalement infecté par des CVA, B et des échovirus (10,128). Les infections cutanéomuqueuses comme le syndrome pied-main-bouche, les exanthèmes comme l'exanthème de Boston, l'Herpangine et la conjonctivite hémorragique sont plutôt des infections à CVA et B, à échovirus et à EV71 (8). Enfin, les CVB et les échovirus infectent le

pancréas, alors que le système nerveux est infecté par des CVA, B, des échovirus, des poliovirus, des EV68 et des EV71 (**Figure 8)** (129–131)**.**

2. Infections persistantes

Certaines infections à EV peuvent évoluer vers des pathologies chroniques (8,13–18). Au cours de la phase aiguë de l'infection, la réplication active des EV permet une diffusion des virions avec une colonisation du tractus gastro-intestinal et une phase lymphatique suivie d'une virémie (8,35). Cette virémie transitoire permet aux virions d'infecter les organes cibles pour s'y répliquer. En réponse à l'infection virale, des mécanismes de défense immunitaire à médiation humorale et cellulaire se mettent en place (11,12). Au cours de l'infection aiguë, les EV modulent les mécanismes de défense de la cellule cible (modulation de l'expression et de la présentation des molécules de CMH (complexe majeur d'histocomptabilité) de classe I à la surface des cellules ; inhibition de la voie NFκB (*nuclear factor-kappa B*) et de la synthèse des interférons de type I), mais aussi la fonctionnalité des cellules dendritiques et de certains lymphocytes T (Cluster de Différentiation (CD) 8+ cytotoxique et *Natural Killer* (NK)), leur permettant d'échapper en partie au système immunitaire (132–134). Ces mécanismes sont responsables de pathologies humaines chroniques, caractérisées par l'absence de virus infectieux détectables en culture cellulaire (absence d'effet cytopathogène (ECP)) et par la détection de protéines ou de génomes viraux (135). Cette persistance virale est notamment décrite dans des pathologies chroniques comme le DT1 et la CMD (136,137).

Aucun effet cytopathogène des EV n'a été rapporté à la phase chronique de la myocardite ; par conséquent, leur rôle dans la CMD a été longtemps considéré comme secondaire (138). Cependant, des travaux récents ont montré que les EV sont non seulement des agents étiologiques de la myocardite aigue, mais qu'ils participent aussi au développement de la pathologie cardiaque sur plusieurs années (139). L'implication des mécanismes viraux dans l'évolution de la maladie cardiaque a été d'abord démontrée par Klingel et al, en utilisant un modèle murin de myocardite induite par le CVB3 (140). L'ARN viral était détecté à la phase aigüe de l'infection (140). À la phase chronique de l'infection, alors qu'aucun effet cytopathogène n'était détectable, des cellules myocardiques positives pour l'ARN de CVB3 ont été détectées (140). Les cellules infectées étaient principalement près des foyers de fibrose,

caractérisant des lésions chroniques de myocardite (140). L'association entre la présence de l'ARN viral et les lésions histologiques a été observée dans trois souches différentes de souris immunocompétentes, avec une forme chronique de pathologie cardiaque (140). En revanche, une clairance virale sans lésion chronique a été observée dans certaines souches de souris (140). Depuis ces premiers résultats, de nombreux auteurs ont rapporté des infections aigues puis persistantes dans le cœur de souris infectées, en fonction du fond génétique des souris et de la souche virale (141–143).

Plusieurs auteurs ont montré que l'ARN viral persistant est capable de se répliquer, et d'avoir une activité de traduction à bas bruit (15,16,18). Certaines protéines virales, telles que les protéases 2A, peuvent cliver des protéines du cytosquelette cardiaque (144,145). Or, la dégradation de protéines du cytosquelette est impliquée dans le développement des cardiomyopathies, notamment de la CMD (146). La production de ces protéases à bas bruit, de façon chronique dans des cellules cardiaques, pourrait donc être un mécanisme primordial expliquant le développement d'une CMD après une myocardite virale.

De plus, des réinfections par d'autres EV pourraient réactiver l'infection persistante cardiaque, aggravant les lésions en progression et le phénotype de cardiomyopathie.

De façon similaire, l'infection persistante par les EV est susceptible de jouer un rôle important dans le déclenchement ou l'aggravation du DT1. Cette hypothèse est appuyée par des données expérimentales chez la souris, notamment l'infection chronique pancréatique par le CVB4, la destruction de cellules bêta et la survenue d'un diabète après 6 mois d'infection (13,17,21).

À ces données expérimentales s'ajoutent des données chez l'Homme. En effet, l'ARN d'EV a été détecté par hybridation *in situ* dans le pancréas de patients avec un DT1 récemment diagnostiqué, mais également chez des individus avec un DT1 ancien (13,147–149). L'infection persistante des cellules des ilots de Langerhans peut induire la destruction des cellules bêta par divers mécanismes (150–152). Une réplication continue du virus peut endommager et perturber le fonctionnement des cellules bêta (150–152). Une infection persistante peut entraîner l'activation prolongée du système immunitaire avec présentation des antigènes viraux et des auto-antigènes aux lymphocytes T dont la conséquence est l'induction d'une réponse immunitaire antivirale et auto-immune susceptible de provoquer la lyse des cellules bêta (150–152).

Les infections à EV peuvent ainsi initier le processus de destruction des cellules bêta (152). Elles sont également capables de l'accélérer à la faveur de réinfections : les lymphocytes T cytotoxiques anti-EV induits par le même virus ou par un autre sérotype, peuvent participer à l'attaque des cellules bêta infectées de manière persistante (13).

La réplication virale persistante et la réaction inflammatoire locale qui l'accompagne peuvent aussi participer au recrutement dans les ilots de lymphocytes T cytotoxiques auto-réactifs (130,150). L'infection, notamment lorsqu'elle est persistante, peut s'accompagner d'une inflammation du pancréas endocrine avec production de médiateurs cytotoxiques, tels que des radicaux d'oxyde nitrique et des cytokines, capables de détruire les cellules bêta.

D. Pathogenèse cardiaque

1. Myocardites

Les myocardites sont définies comme des affections inflammatoires du muscle cardiaque (128). Leurs causes sont nombreuses (**Tableau 4**), leurs manifestations cliniques et leurs pronostics très variables (128). Elles représenteraient 7 à 42 % des causes de mort subite cardiaque (MSC) chez les sujets de moins de 35 ans (153–157). Phillips et al ont rapporté 42% de myocardites chez des militaires américains décédés subitement (153). Maron et al., en revanche, n'ont constaté que 7% de myocardites comme cause de MSC chez l'athlète (155). Tous les auteurs s'accordent pour considérer que la prévalence est sous-estimée en raison d'investigations insuffisantes dans beaucoup d'études (156). Nous avons récemment souligné l'importance de l'autopsie pour le diagnostic des causes de MSC, dont les myocardites [**Annexe 5**] (158).

Tableau 4 : Principales causes des myocardites(128).

Table I Causes of myocarditis/inflammatory cardiomyopathy

1. Infectious myocarditis	
Bacterial	*Staphylococcus, Streptococcus, Pneumococcus, Meningococcus, Gonococcus, Salmonella, Corynebacterium diphtheriae, Haemophilus influenzae, Mycobacterium* (tuberculosis), *Mycoplasma pneumoniae, Brucella*
Spirochaetal	*Borrelia* (Lyme disease), *Leptospira* (Weil disease)
Fungal	*Aspergillus, Actinomyces, Blastomyces, Candida, Coccidioides, Cryptococcus, Histoplasma, Mucormycoses, Nocardia, Sporothrix*
Protozoal	*Trypanosoma cruzi, Toxoplasma gondii, Entamoeba, Leishmania*
Parasitic	*Trichinella spiralis, Echinococcus granulosus, Taenia solium*
Rickettsial	*Coxiella burnetii* (Q fever), *R. rickettsii* (Rocky Mountain spotted fever), *R. tsutsugamuschi*
Viral	RNA viruses: Coxsackieviruses A and B, echoviruses, polioviruses, influenza A and B viruses, respiratory syncytial virus, mumps virus, measles virus, rubella virus, hepatitis C virus, dengue virus, yellow fever virus, Chikungunya virus, Junin virus, Lassa fever virus, rabies virus, human immunodeficiency virus-1 DNA viruses: adenoviruses, parvovirus B19, cytomegalovirus, human herpes virus-6, Epstein-Barr virus, varicella-zoster virus, herpes simplex virus, variola virus, vaccinia virus
2. Immune-mediated myocarditis	
Allergens	Tetanus toxoid, vaccines, serum sickness Drugs: penicillin, cefaclor, colchicine, furosemide, isoniazid, lidocaine, tetracycline, sulfonamides, phenytoin, phenylbutazone, methyldopa, thiazide diuretics, amitriptyline
Alloantigens	Heart transplant rejection
Autoantigens	Infection-negative lymphocytic, infection-negative giant cell Associated with autoimmune or immune-oriented disorders: systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, Churg-Strauss syndrome, Kawasaki's disease, inflammatory bowel disease, scleroderma, polymyositis, myasthenia gravis, insulin-dependent diabetes mellitus, thyrotoxicosis, sarcoidosis, Wegener's granulomatosis, rheumatic heart disease (rheumatic fever)
3. Toxic myocarditis	
Drugs	Amphetamines, anthracyclines, cocaine, cyclophosphamide, ethanol, fluorouracil, lithium, catecholamines, hemetine, interleukin-2, trastuzumab, clozapine
Heavy metals	Copper, iron, lead (rare, more commonly cause intramyocyte accumulation)
Miscellaneous	Scorpion sting, snake, and spider bites, bee and wasp stings, carbon monoxide, inhalants, phosphorus, arsenic, sodium azide
Hormones	Phaeochromocytoma, vitamins: beri–beri
Physical agents	Radiation, electric shock

La myocardite est définie histologiquement comme une nécrose inflammatoire de cause non ischémique (**Figure 9**) (128,159,160). Selon les critères, dits de Dallas, on distingue des myocardites aigues, « *borderline* », et chroniques (159). Des études récentes ont révélé une nette sous-estimation du diagnostic de myocardite à partir des seuls critères histologiques, en raison de problèmes d'échantillonnage, de la faible sensibilité, de la faible reproductibilité et du manque de valeur pronostique (161).Ces critères de Dallas ne permettent de diagnostiquer une myocardite aiguë que chez 10% des sujets présentant des symptômes cardiologiques compatibles d'apparition récente (128,161).

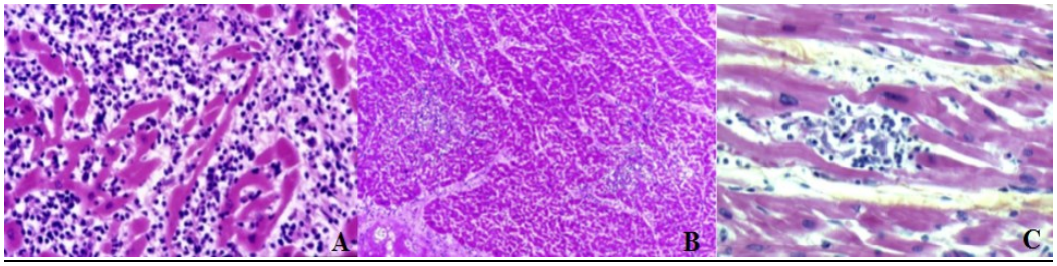


Figure 9: Aspects microscopiques de myocardites aigues.

A : nécrose et infiltrat lymphocytaire diffus (forme rare). X200 ; coloration : HES. B : petits foyers nécrotico-lymphocytaires (forme fréquente). X40 ; coloration : HES. C : Myocardite virale à Parvovirus.

Les acteurs de la réponse immunitaire innée, principalement des lymphocytes T et des macrophages, interviennent très tôt (moins de 6 heures) après l'infection virale, concomitamment aux marqueurs biochimiques (10). À ce stade, le cœur est macroscopiquement normal. En revanche, l'examen microscopique avec un échantillonnage important permet de détecter les foyers inflammatoires précoces. La distribution focale de l'inflammation sur l'ensemble du myocarde expose à des erreurs diagnostiques si le nombre de prélèvements est insuffisant (128).

Des études récentes ont donc souligné l'importance de compléter l'examen histologique par des analyses immunohistochimiques (**Figure 10**) et surtout par des techniques de biologie moléculaire (128). Nous avons souligné que dans le cas de myocardites fulminantes, l'inflammation peut être purement cytokinique et cellulaire, sans nécrose, rendant les analyses immunohistochimiques indispensables [**Annexe 8**] (162).

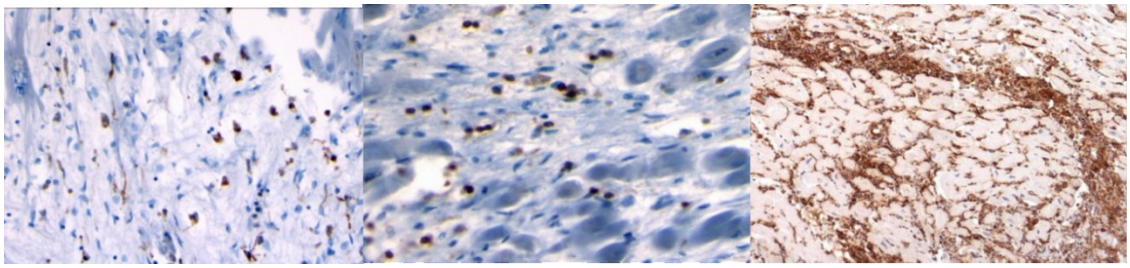


Figure 10: Analyses immunohistochimiques.

De gauche à droite : Immunomarquage CD68 positif (x200), Immunomarquage CD3 positif (x200) Immunomarquage HLA-DR positif (x100)

Les myocardites peuvent avoir des causes diverses, mais les myocardites virales sont de loin les plus fréquentes (128). Leur expression clinique est variable. Elles représentent 5 à 42% des causes de MSC chez le sujet jeune. Elles peuvent rester asymptomatiques, ou parfois être responsable d'insuffisance cardiaque aiguë ou chronique (128). Plus récemment, des myocardites induites par les inhibiteurs de check-points (ICI, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4) ont été décrites (163).La présentation clinique de ces myocardites est hétérogène, avec une fraction d'éjection du ventricule gauche préservée dans la moitié des cas, et des taux élevés d'anomalies de la conduction et d'arythmies ventriculaires (163). La présence d'agent viral dans ces cas de myocardites sous immunothérapies est peu documentée. Notre équipe, en collaboration avec le service de Cardio-oncologie de l'Institut Montsouris de Paris, a décrit un cas de myocardite fulminante, d'apparition tardive sous immunothérapie anti-PD-1, causée par

une infection opportuniste par un échovirus-19 [**Annexe 3**] (164). Ce cas souligne la possibilité d'infection virale cardiaque opportuniste, en cas d'immunodépression induite par un médicament.

Parmi les virus cardiotropes, les EV, et plus spécifiquement les CVB1-B6, le Parvovirus B19 (PVB19), l'Herpès virus de type 6 (HHV6) sont les agents viraux les plus fréquemment impliqués dans les myocardites virales aigues chez les sujets jeunes (< 35 ans)(10,128). Les adénovirus, le cytomégalovirus (CMV) et l'Epstein Barr virus (EBV) sont plus rarement impliqués. Les co-infections virales sont relativement fréquentes : dans 60% des cas, il s'agit d'une association HHV6 - PVB19, comme illustré dans nos précédents travaux et cas cliniques [**Annexes 1, 6 et 7**](165,166).

Les EV et le PVB19 peuvent provoquer des infections aiguës qui peuvent évoluer vers une infection chronique persistante caractérisée par un faible niveau de réplication virale (136,167–169). À l'inverse, les virus appartenant à la famille des Herpesviridae (EBV, CMV, HHV6) peuvent rester à l'état latent à la suite d'une infection aiguë avec un génome détectable sans aucune activité de réplication virale (10,170). Les infections virales persistantes ou chroniques ne sont pas toujours associées à des lésions histologiques (128,158). Dans les cas de détection virale positive avec une histologie négative, il pourrait s'agir d'infections chroniques persistantes associées à des phases de réactivation au cours de l'évolution de la maladie (10,128,167).

Les acides nucléiques des virus cardiotropes sont recherchés par PCR, mais il est essentiel également de quantifier la charge virale (45,165,171). Deux étapes sont nécessaires pour l'interprétation des résultats des analyses virologiques. La première étape est la détection qualitative des acides nucléiques des virus cardiotropes. L'étape suivante consiste à quantifier les acides nucléiques des virus, et à les interpréter en fonction des acides nucléiques totaux extraits. Cette étape est capitale, puisqu'elle permet d'affirmer l'activité de réplication du virus détecté précédemment. Le niveau d'activité de réplication et le type de virus (groupe herpès, EV, PVB19) doivent être pris en compte pour déterminer le rôle du virus détecté dans le déterminisme de la MSC (45,165,166). En effet, des études ont montré la présence fréquente de virus cardiotropes chez des sujets décédés de causes non cardiaques (167,169,172).

Au stade aigu, les myocardites virales passent le plus souvent inaperçues, car asymptomatiques (128). Dans un certain nombre de cas, ces myocardites virales aigues peuvent être responsables d'arythmies et donc de mort subite (128,156,165). Ultérieurement, aux stades

subaigu puis chronique, des modifications morphologiques peuvent survenir, notamment le développement d'une fibrose cicatricielle et de cardiomyopathie dilatée (CMD) (128,136). Des études épidémiologiques ont montré que dans 10% à 30% des cas, les CMD étaient dues à l'évolution de myocardites (24,169,173). Ces CMD peuvent être responsables à long terme d'insuffisance cardiaque chronique et de MSC (139). Une étude comparant le rôle des EV et du PVB19 dans le développement des CMD a montré que seul le génome viral des EV était associé à la présence des marqueurs de l'inflammation cardiaque dans le développement des CMD (169).

La **figure 11** montre les trois phases immunopathologiques, aigue, subaiguë et chronique des myocardites virales :

1. La phase de myocardite aiguë est caractérisée par une virémie active, une entrée du virus dans les cardiomyocytes et une immunité innée. Cette première phase reste habituellement silencieuse en raison de l'activation du système immunitaire inné. Les cellules de la réponse antivirale innée sont les cellules Natural Killer (NK), les monocytes et les macrophages.
2. La phase de myocardite subaiguë est caractérisée par une immunité cellulaire adaptative, une destruction ciblée des cardiomyocytes, une clairance virale et une auto-immunité. Les cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes) vont présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T CD8+. Ces lymphocytes T vont provoquer la destruction ciblée des cardiomyocytes. De plus, des antigènes dérivés de protéines myocardiques partageant des homologies de structures antigéniques avec des protéines virales vont induire la production d'auto-anticorps et par conséquent entretenir la réponse inflammatoire.
3. A la phase de myocardite chronique et du développement d'une CMD, l'inflammation disparaît et les myocytes détruits sont remplacés par une fibrose.

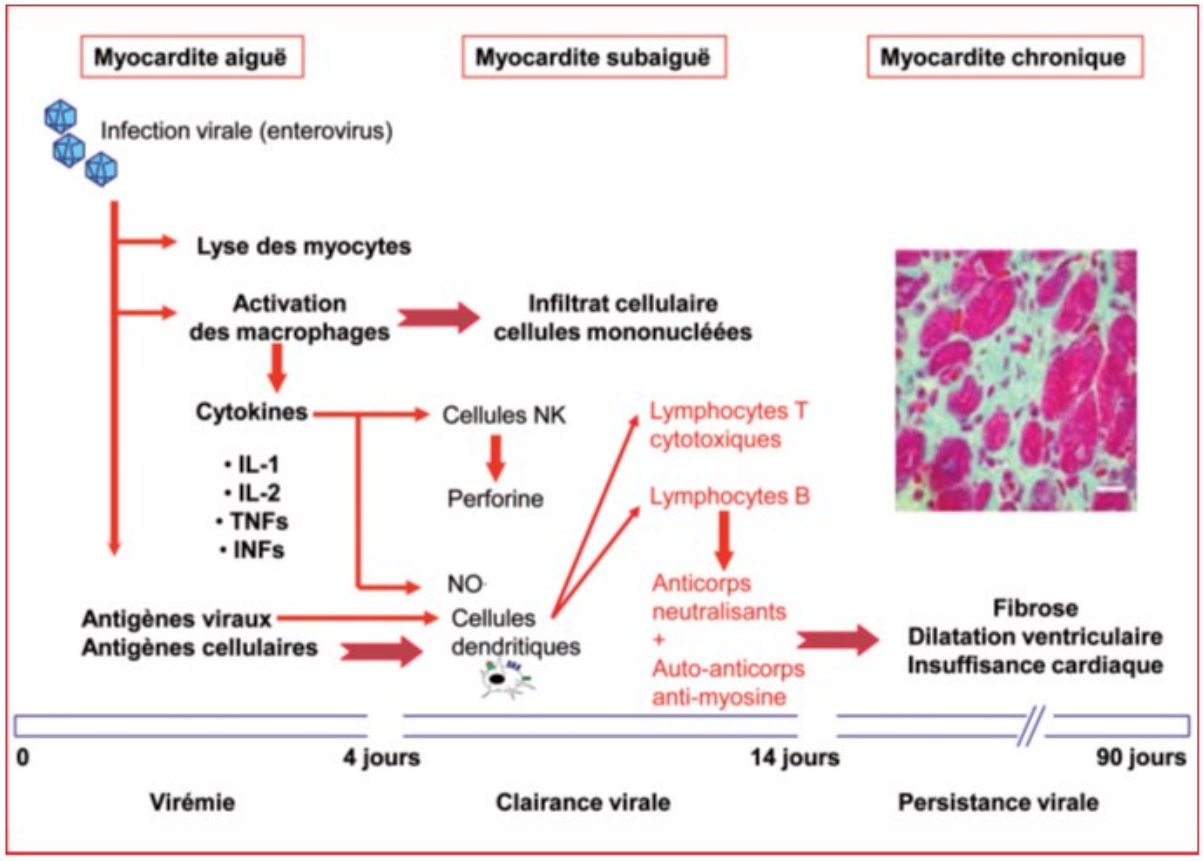


Figure 11: Trois phases immunopathologiques de la myocardite virale.(10)

2. Cardiomyopathie dilatée

Les cardiomyopathies sont définies par *l'American Heart Association* (AHA) comme des maladies du muscle cardiaque qui peuvent être responsables d'insuffisance cardiaque et/ou de troubles du rythme cardiaque (174). L'AHA souligne qu'une grande partie de ces maladies est génétique (174). Parmi les cardiomyopathies génétiques, cette classification distingue d'une part les cardiomyopathies structurales, notamment la cardiomyopathie hypertrophique (CMH), certaines cardiomyopathies dilatées (CMD), la cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène (CVDA), et d'autre part les cardiomyopathies non structurales dénommées canalopathies ou maladies des canaux ioniques (syndrome du QT long, syndrome de Brugada, etc…) (174). La classification de l'AHA est controversée. La classification de la Société Européenne de Cardiologie est utile en pratique clinique (175). Elle permet de distinguer les

cardiomyopathies familiales et non familiales. Elle exclut les canalopathies des cardiomyopathies, contrairement à l'AHA.

La prévalence de la CMD est estimée à 1:2500 (139). En pratique clinique, le diagnostic de CMD est fait par échocardiographie voire par IRM (139).

La maladie est souvent diagnostiquée au stade d'insuffisance cardiaque. Il s'agit de la troisième cause d'insuffisance cardiaque et la première cause de transplantation cardiaque dans le monde (139,176). La CMD expose également à un risque élevé de MSC par arythmies (154).

Macroscopiquement, les quatre cavités sont très dilatées avec une augmentation importante du poids du cœur (**Figure 12**) (158). Histologiquement, l'hypertrophie myocytaire s'associe à une fibrose souvent importante au stade d'insuffisance cardiaque (139).

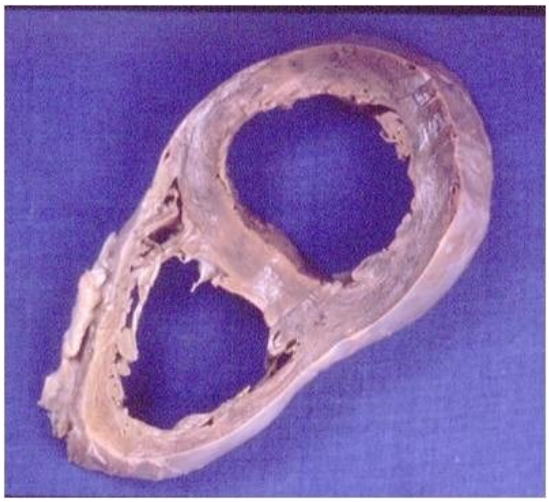


Figure 12: Tranche biventriculaire montrant l'importante dilatation des ventricules

Les étiologies des CMD sont nombreuses (139). Nous avons indiqué les infections virales comme causes fréquentes de CMD au stade chronique (138,173,177). D'autres agents infectieux peuvent être responsables de CMD (certaines bactéries, parasites (maladie de Chagas), …) (139). On considère qu'environ 20-30 % des CMD sont génétiques (146). Une vingtaine de gènes sont incriminés (146). La transmission est principalement autosomique dominante, moins fréquemment récessive liée à X (146). Certains gènes sont sarcomériques tels que ceux impliqués aussi dans la cardiomyopathie hypertrophique, mais d'autres codent pour des protéines du cytosquelette ou d'autres protéines (146).

Les connaissances sur la physiopathologie des myocardites à EV s'appuient principalement sur des modèles animaux (128,141,143,168,178,179). L'inoculation intra-péritonéale d'un EV, notamment des CVB, dans plusieurs modèles murins, induit une

myocardite aiguë (143). Après une quinzaine de jours d'infection, l'effet cytopathogène n'est plus détectable en culture cellulaire (141,143). Les lésions histologiques cardiaques chez la souris sont similaires à celles observées chez l'Homme (141). Ces modèles *in vivo* ont montré le passage d'une myocardite aiguë virale à une forme chronique et/ou une CMD (141,143,179).

3. Génétique

Récemment, plusieurs auteurs ont étudié les prédispositions génétiques aux myocardites. En 2016, Amiel et al. ont montré que, dans trois familles distinctes, des variants génétiques dans le gène codant pour la PPA2 (pyrophosphatase mitochondriale) étaient responsables de morts subites chez des nourrissons, avec un aspect histologique de myocardite, sans agent viral causal détecté (180). L'équipe de Casanova et al. a également montré que certains variants génétiques liés aux cardiomyopathies pourraient être des facteurs favorisant de myocardites virales (181).

Des publications ont rapporté des associations entre des cardiomyopathies et des myocardites, notamment la présence de PVB19 associée à des canalopathies. Buob et al. ont publié un cas de mort subite chez un homme de 35 ans avec des signes ECG typiques du syndrome de Brugada et une myocardite à PVB19 révélée par PCR (182). Dans cette observation, les auteurs ont suggéré que la myocardite virale formait un substrat arythmogène, ou constituait un mécanisme de déclenchement de l'arythmie mortelle sur le syndrome de Brugada. Juhasz et al. ont publié un cas similaire de mort subite chez un homme de 22 ans souffrant d'une infection respiratoire (183). Pendant sa période de convalescence, un syndrome de Brugada a été diagnostiqué. Deux mois et demi après l'épisode infectieux, il est décédé d'une myocardite à PVB19. Salerno et al. ont décrit des anomalies ECG correspondant à trois types de canalopathies (syndrome de Brugada, syndrome du QT court et syndrome de repolarisation précoce) chez 3 patients atteints d'une myocardite virale compliquée de fibrillation ventriculaire (184). Chez les 2 patients qui ont survécu à la myocardite aigue, les anomalies retrouvées à l'ECG ont persisté, suggérant qu'elles n'étaient pas dues à la myocardite elle-même. Ces données ont suggéré aux auteurs que les canalopathies pourraient prédisposer aux arythmies ventriculaires lors de myocardites virales aigues.

Frustaci et al. ont publié une cohorte de sujets atteints de CMH instables cliniquement avec ou sans myocardite virale diagnostiquée par histologie, immunohistochimie et PCR (185). Dans cette cohorte, une forte prévalence de détection virale positive était mise en évidence, suggérant que la CMH serait un facteur prédisposant aux infections virales myocardiques. Bowles et al. ont publié une série de 12 cas de CVDA comparée à 215 cas témoins avec détection virale par PCR (186). La prévalence de détection virale positive était supérieure dans les cas de CVDA par rapport aux témoins, sans qu'un rôle précis de ces infections ne soit déterminé.

Dans le cas d'un sujet décédé d'une MSC et atteint d'une cardiomyopathie génétique avec détection virale positive, le rôle du ou des virus doit être discuté en fonction des résultats des analyses histologiques, immunohistochimiques et de la quantification de la charge virale. Les virus peuvent avoir un rôle étiologique (indéniable dans les cas de myocardites aiguës fulminantes), un rôle de cofacteur arythmogène ou simplement être présents de manière fortuite dans le cadre d'un portage latent asymptomatique à la suite d'une infection ancienne (virus « *bystander* »).

Des phases d'aggravation cliniques de CMH et de CVDA ont été décrites en relation avec des myocardites (181,185,186). La variabilité d'expression clinique des cardiomyopathies génétiques au sein d'une même famille pourrait être en partie expliquée par ces surinfections sporadiques, qui vont aggraver parfois temporairement, parfois définitivement les symptômes (146,181,187). Cette aggravation peut être brutale dans le cadre d'une myocardite aigue fulminante, mais pourrait également être discrète, la majorité des myocardites aigues virales étant pauci-symptomatique. Une myocardite chronique pourrait, lors de réactivations virales, entraîner des phases d'aggravations multiples espacées dans le temps.

Par ailleurs, le chevauchement phénotypique entre les différentes formes de cardiomyopathies, notamment avec les CMD, pourrait s'expliquer par une surinfection par un EV. L'un des mécanismes physiopathologiques étudié de l'évolution des infections cardiaques à EV en CMD est l'inactivation par phosphorylation de la protéine cardiaque chaperone Alpha-B cristalline (CryAB) (188). Des mutations de CryAB sont également impliquées dans des desminopathies avec CMD, par un mécanisme d'agrégation anormale et de rupture des filaments de desmine (189). Ce mécanisme est mimé lors d'une infection à EV par inactivation de CryAB par phosphorylation et aboutit à une hypertrophie-dilatation des ventricules (188).

Chez des souris déficientes en dystrophine, il a été démontré que l'infection par un EV pouvaitaugmenter la sévérité et la pénétrance de la cardiomyopathie (145). De plus, l'activité de clivage des protéases virales est augmentée par des mutations dans le gène codant la dystrophine, aggravant le phénotype de la CMD chez la souris(144). En outre, plusieurs variants de gènes codant pour des protéines du cytosquelette ont été associées à la progression de la CMD post-myocardite (181). Ces études suggèrent que les mutations affectant les gènes codant pour les protéines du cytosquelette augmentent la susceptibilité des cellules cardiaques à l'infection virale et le développement de la CMD. Le lien chez l'Homme entre ces génotypes de cardiomyopathies et l'infection par les EV reste à étudier (**Figure 13**).

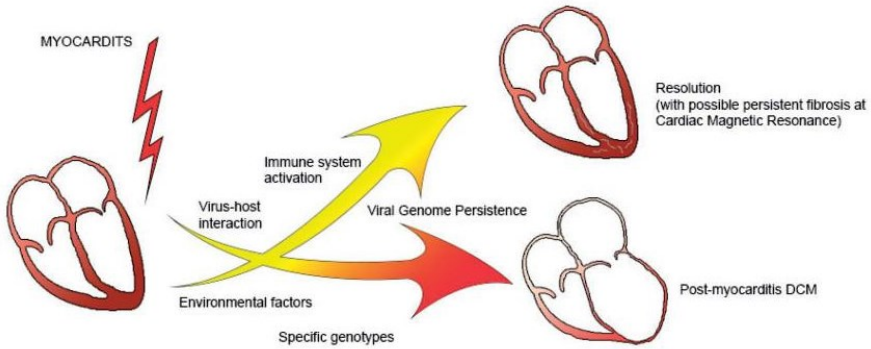


Figure 13: Représentation schématique de la physiopathologie de la myocardite et de la cardiomyopathie dilatée.*(136)*

4. Thérapeutiques

L'AHA suggère qu'en cas de forte suspicion de myocardite fulminante à médiation immunitaire, une corticothérapie doit être administrée d'urgence, avant que le diagnostic ne soit confirmé par biopsie ou que d'autres tests diagnostiques ne soient effectués (190). L'immunoglobuline (IG) intraveineuse (IV) (à une dose allant de 0,5 g à 1 g/kg) est fréquemment utilisée dans la myocardite lymphocytaire pédiatrique (**Figure 14**) (191). Même s'il n'est pas standardisé, un traitement d'entretien avec des corticoïdes à faible dose, souvent en association avec du mycophénolatemofétil, de la ciclosporine ou de l'azathioprine (AZA) comme médicaments d'épargne des corticoïdes, peut être utilisé chez les patients présentant une faible récupération fonctionnelle associée à la persistance d'un dosage de troponine augmenté ou à tout signe d'inflammation myocardique résiduelle (191). Selon plusieurs auteurs, même si

le nombre de série est limitée, des charges virales élevées peuvent contre-indiquer l'utilisation de l'immunosuppression en faveur d'un traitement avec des médicaments antiviraux ou avec des agents stimulant la réponse immunitaire native (par exemple, l'interféron-β) (190–192). La myocardite aigue lymphocytaire peut également être associée à des pathologies auto-immunes ou inflammatoires systémiques (par exemple, le lupus érythémateux systémique, les troubles intestinaux inflammatoires, COVID-19) (191).

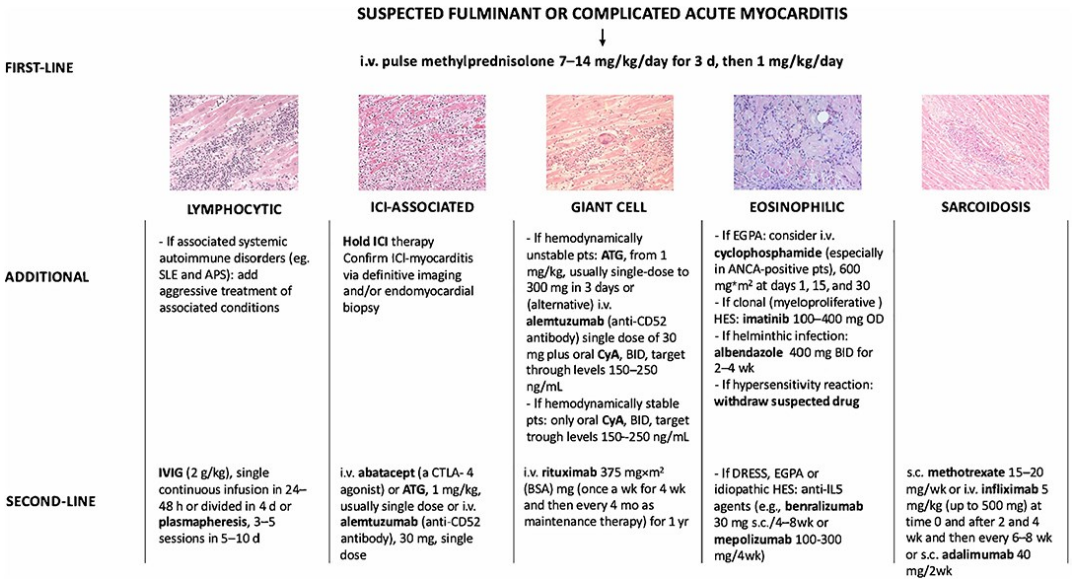


Figure 14: Stratégies thérapeutiques dans les myocardites aigues.(191)

L'utilisation d'immunomodulateurs est en cours d'étude, notamment l'Anakinra, la forme recombinante de l'interleukine 1α (IL-1Rα), médicament bloqueur de l'activité de l'IL-1α et de l'IL-1β (étude ARAMIS : NCT03018834).

E. Pathogénèse pancréatique

1. Pancréatite

La pancréatite aiguë (PA) est une maladie inflammatoire affectant la partie exocrine et/ou endocrine du parenchyme pancréatique (193). Il existe des présentations cliniques peu symptomatiques bénignes (pancréatite aiguë interstitielle) et des formes sévères (pancréatite aiguë nécrosante). Elle peut également s'étendre au-delà du tissu pancréatique jusqu'à la région péripancréatique et est habituellement associée à une réponse inflammatoire systémique, qui, si elle n'est pas traitée correctement, peut aboutir à une défaillance de plusieurs organes.

La PA peut se traduire histologiquement par un œdème interstitiel, un infiltrat de cellules inflammatoires, de la nécrose et de l'hémorragie (193). L'inflammation puis des lésions chroniques (fibrose, remplacement adipeux) peuvent causer un dysfonctionnement exocrine et/ou endocrine (193).

Les causes principales de PA sont les calculs biliaires et l'alcool (193–195). Environ 10% des cas seraient de cause infectieuse (193–196). Ces micro-organismes incluent des virus (par exemple les oreillons, les CVB, et l'hépatite), *Mycoplasma pneumoniae* et la leptospirose), et des parasites (par exemple Ascaris lumbricoides, Fasciola hepatica, et la maladie hydatique). La première étiologie de PA infectieuse est virale, notamment par les CVB, le CMV, le VIH, l'HSV, le virus des oreillons, le virus varicelle-zona, etc (196).

Certaines études ont montré un risque de développer un diabète après une PA (**Figure 15**) (197). En effet, après une PA, des hyperglycémies transitoires sont détectées chez certains patients (194). Certaines études suggèrent que l'homéostasie du glucose se rétablit complètement, alors que d'autres démontrent qu'elle est persistante chez une proportion considérable de patients (193,197,198). Une étude récente a démontré que les patients présentant une hyperglycémie transitoire au cours d'une pathologie aiguë ont un risque plus élevé de développer un diabète (199).L'influence de l'étiologie de la PA sur l'incidence du diabète est encore peu connue.

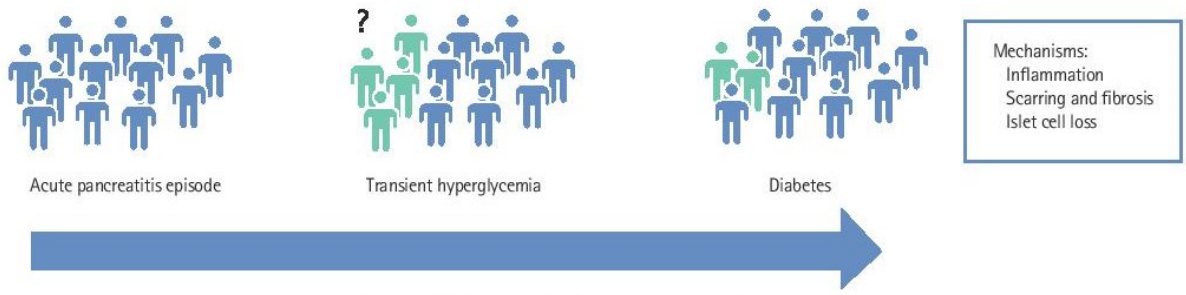


Figure 15: Représentation schématique de l'évolution d'une pancréatite aigüe avec hyperglycémie transitoire vers un diabète.*(198)*

2. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie chronique caractérisée par une production réduite d'insuline, causée par une destruction progressive des cellules βpancréatiques productrices d'insuline (200).Les cellules β sont localisées dans les îlots de Langerhans, aussi appelés pancréas endocrine, en opposition avec le tissu exocrine (200).En 2019, la Fédération Internationale du Diabète (*International Diabetes Federation*, IDF) a estimé le nombre de diabétiques à plus de 463 millions dans le monde, et le DT1 concernerait 10% de tous les cas de diabète (201). L'incidence annuelle du DT1 diffère d'une région du monde à l'autre, allant de moins de 1 pour 100 000 habitants en Asie, à environ 15 pour 100 000 aux USA, et dépassant les 30 pour 100 000 en Scandinavie (201,202). Un gradient nord-sud dans l'incidence a été constaté en Europe (202,203). En France, on estime que 150 000 personnes sont victimes de la maladie, et l'incidence est d'environ 10 nouveaux cas pour 100000 habitants par an (203). L'incidence du DT1 a augmenté partout dans le monde à raison d'environ 3 à 4% par an depuis les années 2000, notamment chez les enfants de moins de 5 ans (204).

L'entrée dans la maladie caractérisée par une hyperglycémie supérieure à 2 g/l (la limite supérieure étant de 1,26 g/l à jeun), peut se traduire par une polyurie, une polyphagie, une polydipsie, une perte de poids, une fatigue, ou un profond déséquilibre de l'homéostasie glycémique accompagné de cétose ou d'acidocétose, pouvant aboutir à un coma et au décès (200). L'évolution de la maladie est marquée par des complications, avec une morbidité importante : microangiopathie, accidents vasculaires cérébraux, rétinopathie, cataracte, glaucome, hypertension, cardiopathie ischémique, glomérulosclérose, neuropathie autonome,

vasculopathie périphérique, gangrène... Le poids de la maladie est lourd en termes de répercussions sur la qualité de vie des individus, et de dépenses de santé et de mortalité (200).

Des facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux sont impliqués dans l'étiopathogénie du DT1 (200,205). De nombreux gènes et leurs variants sont associés à un sur-risque de DT1 (200). La prédisposition génétique majeure du DT1 inclue notamment des gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, mais également ceux du gène de l'insuline (en particulier ceux de la région VNTR « *variable number of tandem repeats* » en 5'), ainsi que d'autres loci dont l'implication est moins bien documentée. Des variants du gène IFIH1 (*Interferon Induced With Helicase C Domain 1*) codant pour MDA5 (*Melanoma differentiation-associated protein 5*),un senseur de l'immunité innée permettant la détection d'ARN viraux double brins de grande taille, ont été associés à un sur-risque de DT1 (200,206). La génétique n'est cependant pas suffisante pour expliquer le développement de la pathologie, comme le prouvent plusieurs études chez des jumeaux homozygotes (207). Par ailleurs, l'augmentation de l'incidence du DT1 durant les dernières décennies ne peut s'expliquer par une susceptibilité génétique accrue de la population (204).

La progression du processus auto-immun est généralement lente et peut durer plusieurs années avant que n'apparaissent des manifestations cliniques qui signent l'entrée dans la maladie (200). La phase subclinique est caractérisée par la circulation d'auto-anticorps ciblant les antigènes des cellules bêta : ICA « *islet-cell autoantibodies* » anticorps dirigés contre les cellules des îlots, IAA « *insulin autoantibodies* » contre l'insuline, GADA « *GAD65 autoantibodies »* contre la glutamate décarboxylase, ou encore IA-2A « *IA-2 autoantibodies* » contre la molécule IA-2 (200).

Il a été noté que moins de 5 % des sujets génétiquement prédisposés au DT1 développent la maladie, et que le taux de concordance chez les jumeaux monozygotiques n'est que de 30 à 50 % (200,205,206). Des facteurs environnementaux jouent donc un rôle important dans la pathogénèse de la maladie chez des sujets génétiquement prédisposés (200,205). Parmi les facteurs exogènes, les infections virales ont été rapportées dans la littérature en lien avec le développement du DT1 (205). Les variations géographiques et saisonnières de l'incidence du DT1 ont été associées à des épidémies par des virus communs à tropisme glandulaire, tels que les EV, les virus de la rubéole ou des oreillons, ainsi que le CMV, les rétrovirus et les rotavirus (137,200,205,208).

Les mécanismes de la pathogenèse virale du DT1 sont multiples (**Figure 16**)(200). Des facteurs génétiques, toxiques, environnementaux et immunitaires ont été décrits. Les infections virales ont été rapportées tardivement comme pouvant être en lien avec le DT1, du fait de la difficulté d'obtenir des échantillons humains de pancréas avec un DT1. La compréhension de la pathogénèse virale du DT1 s'appuie sur des modèles murins, susceptibles ou non au diabète (13).

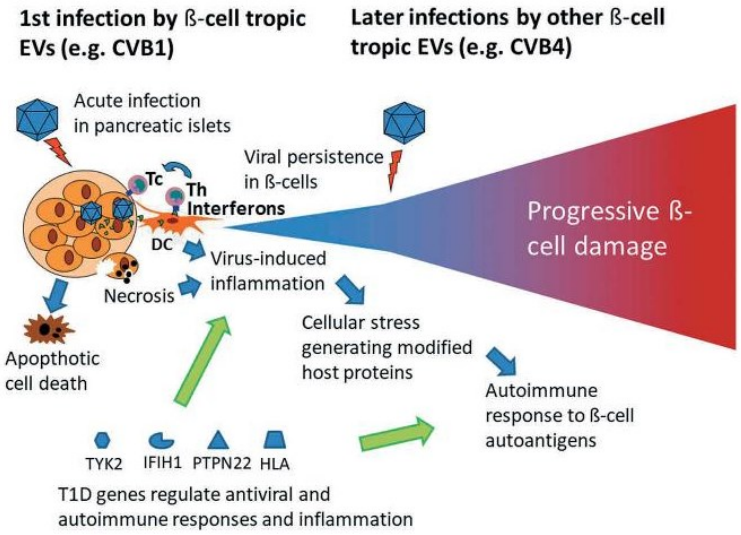


Figure 16 : Pathogénèse de l'infection des cellules β par un entérovirus (EV) et du diabète de type 1 (T1D)

Le virus infecte les cellules β productrices d'insuline dans le pancréas, ce qui entraîne une persistance virale et une inflammation dans les îlots infectés. La réponse antivirale de l'hôte est modulée par les polymorphismes des gènes régulant la réponse immunitaire contre les EV. Ces polymorphismes sont associés au T1D (par exemple, IFIH1, PTPN22, TYK2, HLA). L'interaction virus-gène diabétogène est caractérisée par une réponse inflammatoire et l'induction d'une auto-immunité.(209)

3. Génétique

Plusieurs auteurs ont montré que les allèles associés à un sur-risque de DT1 étaient situés sur des gènes codant des protéines impliquées dans la réponse immunitaire innée antivirale. Le plus étudié est le gène IFIH1, codant pour la protéine MDA5, un senseur de l'immunité innée, reconnaissant des ARN viraux double brins, dont les EV (206). En présence d'allèles particuliers du gène IFIH1, la réponse interféron (IFN) des îlots de Langerhans est altérée (206). Les IFN régulent à la hausse les molécules HLA de classe I, en augmentant la présentation d'auto-antigènes aux cellules immunitaires (150). D'autres gènes impliqués dans la réponse immunitaire contre les infections virales, tels que PTPN2 (*Protein Tyrosine Phosphatase Non-*

Receptor Type 2) et TYK2 (*Tyrosine Kinase 2*), présentent des allèles associés à un sur-risque génétique du DT1 (210). Ces gènes favorisent le stress du réticulum endoplasmique, ce qui entraîne une altération de la fonction et de la survie des cellules bêta. Le lien entre les facteurs environnementaux (exposome viral) et la prédisposition génétique identifiée dans le DT1 suggère que la réponse immunitaire de l'hôte face aux EV est cruciale dans la pathogénèse du DT1 (137,200,211). Dans l'ensemble, les données épidémiologiques indiquent une association entre l'infection par les EV et l'auto-immunité dans le DT1, tandis que les données génétiques montrent un lien entre le DT1 et la réponse immunitaire anti-EV.

4. Thérapeutiques

La principale stratégie thérapeutique étudiée à ce jour est la vaccination (212). Des vaccins efficaces et sûrs ont été développés contre les poliovirus et l'EV71, mais aucun vaccin n'est disponible pour les EV spécifiquement pour le DT1 (71,213). Des études précliniques récentes ont montré qu'un vaccin contre les CVB prévient l'infection virale et l'induction du diabète chez des souris (214,215). Il est essentiel de déterminer quels sérotypes de virus sont associés au DT1 dans différentes régions géographiques et à différentes périodes. Les informations existantes guident le développement d'un vaccin polyvalent dirigé contre les sérotypes de CVB. Plusieurs études épidémiologiques sont en cours pour identifier ces souches d'EV, notamment dans le cadre de l'étude TEDDY (*EnvironmentalDeterminants of Diabetes in the Young*) (menée aux États-Unis et en Europe) et l'étude DIPP (*Type 1 DiabetesPrediction and Prevention*) (en Finlande) (216–218). Une étude clinique est en cours pour évaluer un candidat vaccin contre les CVB dans le DT1, PROVENT. PROVENT est une étude de phase 1, contrôlée par placebo, en double aveugle et randomisée, menée au *Clinical Research Services Turku* - CRST, en Finlande. Les premiers résultats ont montré que le PRV-101 (vaccin polyvalent contre les CVB) était bien toléré chez les adultes jeunes.

Un vaccin dirigé contre les EV peut être efficace pour la prévention primaire et secondaire du DT1, en arrêtant le déclenchement de l'auto-immunité et en bloquant le début du dysfonctionnement et de la mort des cellules bêta à médiation immunitaire (**Figure 17**). Les mécanismes de la prévention secondaire avec un vaccin dirigé contre des EV pourraient inclure : (1) la prévention d'infections répétées des îlots de Langerhans ; (2) la prévention d'une

infection systémique pour empêcher une réactivation des lymphocytes mémoires ou une rechute ; et/ou (3) la limitation d'une infection initiale intestinale par les EV, pour empêcher l'infection pancréatique (219). Un vaccin contre les EV ne permettra pas d'empêcher totalement le développement de DT1, s'agissant d'une pathologie multifactorielle, néanmoins il s'agit de l'agent viral exogène le plus souvent identifié comme agent déclencheur dur DT1 chez les enfants (219).

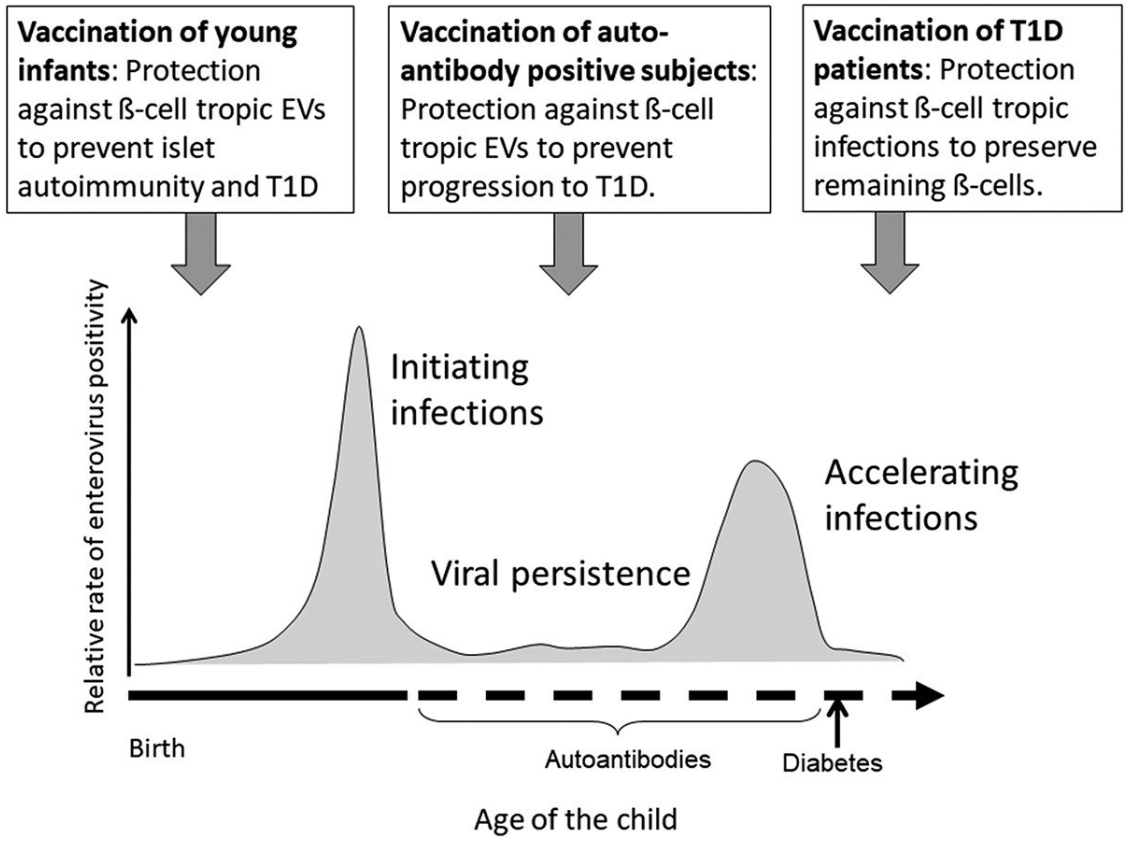


Figure 17: Représentation schématique d'une stratégie de prévention et thérapeutique dans le diabète de type 1 induit par l'infection par entérovirus.*(219)*

Une alternative potentielle à la vaccination, testable dans des essais de prévention secondaire et tertiaire est le traitement par des médicaments antiviraux pour éliminer une infection chronique établie du pancréas. L'un de ces essais cliniques (*Diabetes Virus Detection and Intervention Trial* [DiViDInt]), lancé en 2018, a inclus des personnes atteintes d'un DT1 nouvellement diagnostiqué pour un essai randomisé, contrôlé par placebo et en double aveugle, afin de tester une combinaison de deux médicaments antiviraux (pleconaril et ribavirine). Les résultats de cet essai clinique de phase 2 ne sont pas disponibles à ce jour. Les antiviraux se sont révélés efficaces *in vitro* sur des lignées cellulaires pancréatiques présentant des infections persistantes à EV (220).

III. Réponse immunitaire

Les EV infectent l'organisme principalement par voies digestive, aériennes (aérosols) ou par les muqueuses (conjonctive, sphère oto-rhino-laryngologique [ORL]), à partir de gouttelettes liquidiennes ou de lésions cutanées infectées (8). La muqueuse épithéliale du rhinopharynx constitue avec les amygdales le premier site de réplication des EV, 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 (8).

Les cellules dendritiques des 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 (11,124). Une première phase de circulation lymphatique ou virémie primaire permet au virus d'atteindre les organes cibles (8). La réplication active des EV dans les cellules cibles est responsable d'une réponse immunitaire innée, cellulaire et cytokinique pour limiter la propagation de l'infection au niveau local (11,221–223). À cette réponse immunitaire innée fait suite une réponse adaptative avec la mise en place d'une immunité spécifique avec l'activation des lymphocytes T et B (**Figure 18**)(10). Le rôle des lymphocytes B, induisant une immunité à médiation humorale, est de sécréter des anticorps neutralisants pour limiter la phase de virémie initiale qui précède la colonisation des tissus cibles. Des anticorps tels que les IgG et IgA sécrétoires (IgAs) peuvent bloquer l'infection virale au niveau de l'oropharynx et de l'intestin (8,11). Les lymphocytes T, les cellules *killer* (K) et les cellules *natural killer* (NK) jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire antivirale (11,124,224).

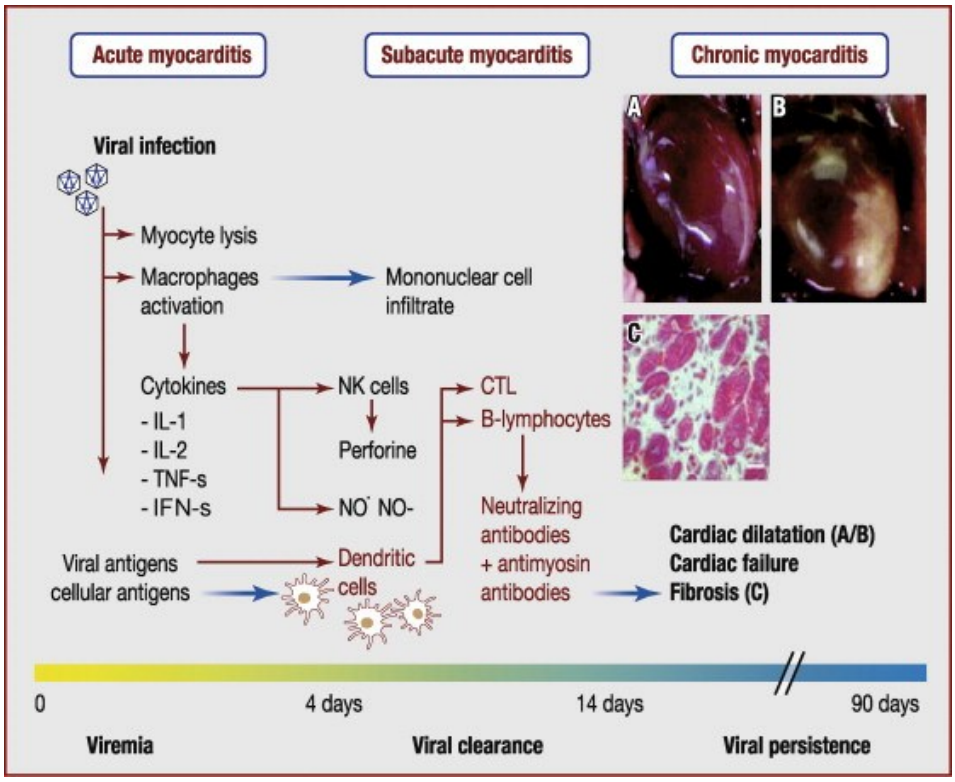


Figure 18: Pathogénèse de la myocardite aigue, subaiguë et chronique à entérovirus

Le virus infecte les cellules cardiaques cibles (cardiomyocytes, fibroblastes) et induit une lyse cellulaire, l'infiltrat de cellules inflammatoires et une inflammation cytokinique. Certains antigènes viraux et cellulaires vont induire une auto-immunité. La persistance virale, l'inflammation et l'auto-immunité sont responsables de lésions cardiaques et d'une dilatation des cavités.(10)

La réponse immunitaire induit une inflammation locale, avec des lésions tissulaires, modulant la sévérité et la durée des signes cliniques (8,10). La modulation de la réponse inflammatoire et l'activation des cellules immunitaires sont parfois à l'origine d'une auto-immunité humorale ou cellulaire identifiée dans certaines infections chroniques persistantes à EV comme le diabète de type 1 ou les myocardites chroniques (**Figure 18**)(10,225). Comme d'autres virus à ARN, les EV possèdent différentes stratégies pour échapper à la surveillance du système immunitaire, par la sélection de variants viraux, l'action de protéases virales ou l'infection de cellules immunitaires (226–229).

A. Immunité innée

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) par les récepteurs de reconnaissance de profils (*Pattern Recognition Receptor*, PRR)(221,230–232). Les acides nucléiques viraux, Acide RiboNucléique (ARN) ou Acide DésoxyriboNucléique (ADN), simple ou double brins (sb et db) sont des PAMP. Les PRR sont des éléments incontournables dans la détection et l'induction de la réponse innée aux agents pathogènes pour induire une clairance virale. Parmi ces senseurs de l'immunité on distingue les *Toll-Like Receptors* (TLR), les *RIG-I Like Receptors* (RLR) et enfin les *NOD-Like Receptors* (NLR) (230,233,234).

1. Récepteurs Toll-like

Les TLR sont au nombre de 10 chez l'Homme et de 13 chez la souris (235). Les TLR sont des protéines très conservées au cours de l'évolution, qui peuvent être extra ou intracellulaires, et jouent un rôle important dans la mise en place de l'immunité antivirale de l'hôte. Les TLR-3, -4, -7, -8, -9 sont impliqués dans l'immunité antivirale (235,236). Après liaison avec des ligands d'ADN, d'ARN ou de protéines, les TLR initient des changements de conformation de leurs domaines extracellulaires et cytoplasmiques pour recruter des molécules adaptatrices de leurs voies de signalisation (236).L'activation de facteurs de transcription, tels que NF-κB et *Activator Protein-1* (AP-1), permet la transcription de nombreuses cytokines (**Figure 19**)(236).

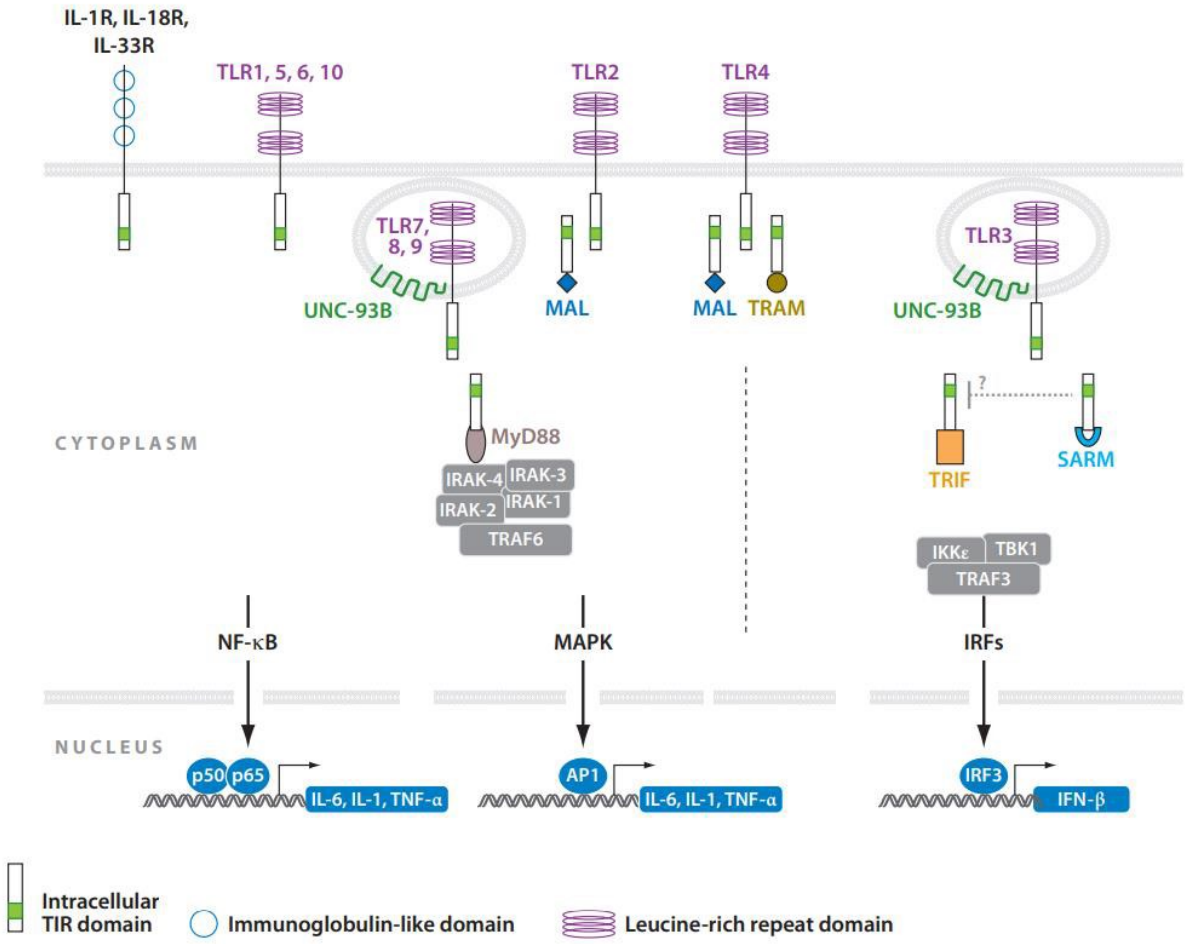


Figure 19: Les voies de signalisations des TLR impliquées dans la réponse antivirale.

Les TLR 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-adapteurs spécifiques (MAL ou TRAM) ou des régulateurs négatifs (SARM) des complexes TIR. S'ensuit une cascade d'activation des complexes kinases spécifiques (IRAKs ou IKKε / TBK1), conduisant à l'expression de gènes spécifiques via les facteurs de transcription NF-κB, AP1 et IRF. (IKKε / TBK1, IκB kinase ε / TANK-binding kinase 1; IRAK, Kinase associée à l'IL-1R; MAL, type adaptateur MyD88; SARM, protéine stérile α et HEAT / motif tatou; TIR, récepteur Toll-IL-1; TRAM, molécule adaptatrice liée au TRIF; TRIF, IFN-β induisant l'adaptateur contenant un domaine TIR.).(236)

TLR3 est un récepteur endosomal, exprimé de façon constitutive dans la plupart des cellules, capable de reconnaître l'ARN double brin (236). TLR3 induit une réponse interféron (IFN) par un adaptateur spécifique TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) et un facteur de régulation de l'IFN, IRF3 (*IFN regulatory factor 3*)(236). La réponse antivirale médiée par TLR3 est importante dans la lutte contre l'infection par les poliovirus et les CVA et B (236,237). De plus, des études *in vitro* ont souligné l'importance de l'adaptateur TRIF pour l'induction d'une réponse IFN efficace lors d'une infection à EV (238).

D'autres TLR sont impliqués dans la réponse immunitaire anti-EV, tels que TLR4, connu pour détecter les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram-négatives (236). TLR4 est un des récepteurs activés dans les infections à CVB. Il est impliqué dans l'induction de

cytokines pro-inflammatoires et le développement de pathologies chroniques telles que le diabète de type 1 (DT1) et les cardiomyopathies dilatées (CMD) (150,177,236). Parmi les TLR, les récepteurs endosomaux TLR7 et TLR8 détectent l'ARNsb au cours des infections à EV (236).

2. Récepteurs RIG-I-like

Les RLR sont des hélicases (233,235). Au sein de cette superfamille d'hélicases, on dénombre actuellement trois récepteurs : *Retinoicacid Inducible Gene* (RIG-I), *Melanoma Differentiation-Associated 5* (MDA5) et *Laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP2) (**Figure 20**)(233,239). 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) (233,239). Ce domaine est également présent au niveau de leur adaptateur mitochondrial commun appelé *CARD adaptor inducing IFN-β* (CARDIF) ou *IFN-β Pormoter Stimulation* (IPS-1) ou *Mitochondiral Anti Viral Signaling protein* (MAVS) (**Figure 20**)(239). Les domaines CARD sont régulés par des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination et la phosphorylation. LGP2 ne possède pas de domaine CARD. Les RLR possèdent un domaine hélicase conservé à motif « *DEAD box* » ATPase dépendant. À leur extrémité carboxy-terminale (C-terminale), les RLR possèdent un domaine conservé appelé CTD (*C-Terminal Domain*) qui est responsable de la spécificité d'attachement aux ARN viraux : ARNdb, ARNsb ou présentant un groupement tri-phosphate à l'extrémité 5' (**Figure 20**)(239). Le 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 observée que pour les récepteurs RIG-I et LGP2 (239).

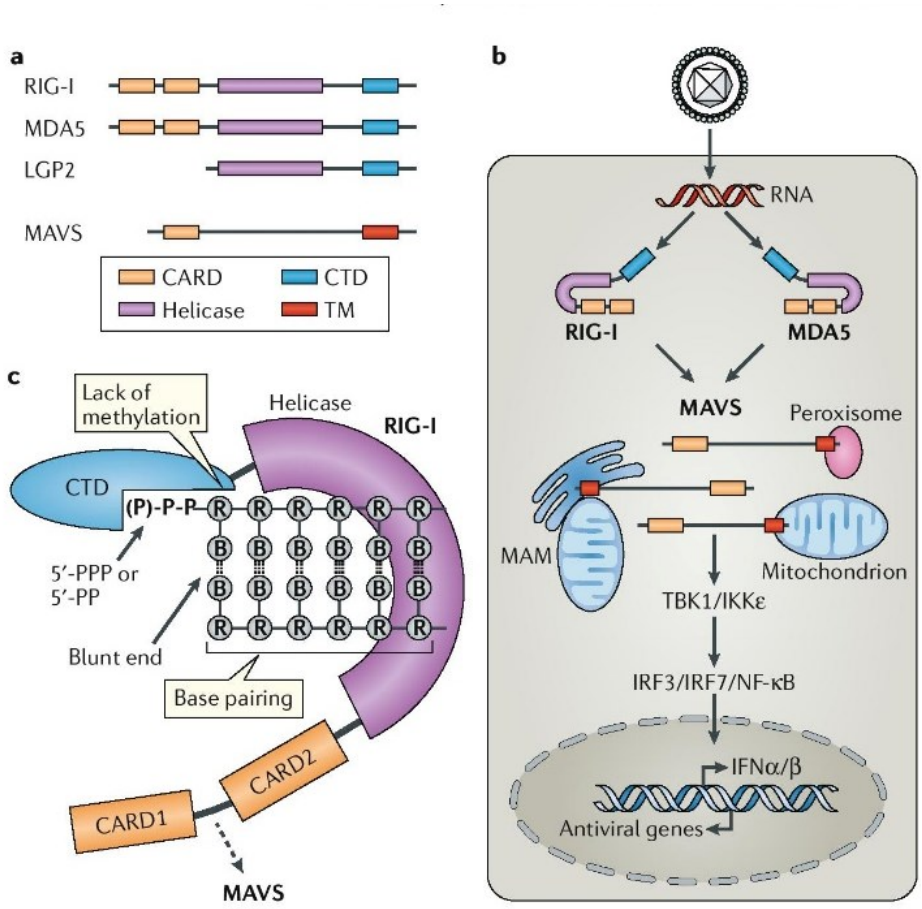


Figure 20: Représentation schématique des structures des RIG-I Like Receptors (RLR) et leur adaptateur MAVS.

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. MAVS comporte un domaine CARD homologue, d'une région riche en proline (Pro) et d'un domaine transmembranaire (TM) à son extrémité C-terminale.(239)

La spécificité de reconnaissance de certaines familles de virus permet de caractériser les RLR : 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, tandis que MDA5 reconnait majoritairement les virus de la famille des *Picornaviridae* et plus spécifiquement les EV-B dont les CVB (239–242).

Après la fixation de leurs ligands spécifiques, RIG-I et MDA5 vont interagir avec un facteur protéique important pour l'activation de la réponse IFN de type 1 (IFN-1) : la protéine MAVS (239). Cette protéine MAVS possède 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. À son extrémité C-terminale, elle possède un domaine transmembranaire permettant son ancrage à la membrane mitochondriale et à la surface des

peroxysomes (**Figure 21**)(239). 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 (*Tripartite Motif Containing 25*). Une fois activés, RIG-I et MDA5 interagissent avec MAVS par leurs domaines CARD respectifs (**Figure 21**)(239). L'activation de MAVS permet le recrutement de plusieurs facteurs dont des membres de la famille des TRAF (*Tumor necrosis factor (TNF) Receptor-Associated Factors*). Le recrutement de TRAF3 permet ensuite l'activation de la transcription du gène codant pour l'IFN-β, par les facteurs IRF-3/7 et NF-κB, et la signalisation induite par les protéines kinases IKK (*Inhibitor of NFKB Kinase*). Le recrutement de TBK1 et IRF-3 au niveau de MAVS est assuré par la protéine STING (*STimulator of INterferon Genes*). STING est une protéine transmembranaire nécessaire pour la production d'IFN-1 à la suite d'une infection virale et est située en aval des RLR et de MAVS (243). Le nombre important de facteurs impliqués dans la transmission du signal à partir de l'ARN viral cytoplasmique jusqu'à l'activation de NF-κB et IRF-3 et 7 permet d'établir de nombreux points de contrôle dans la voie de signalisation (239).

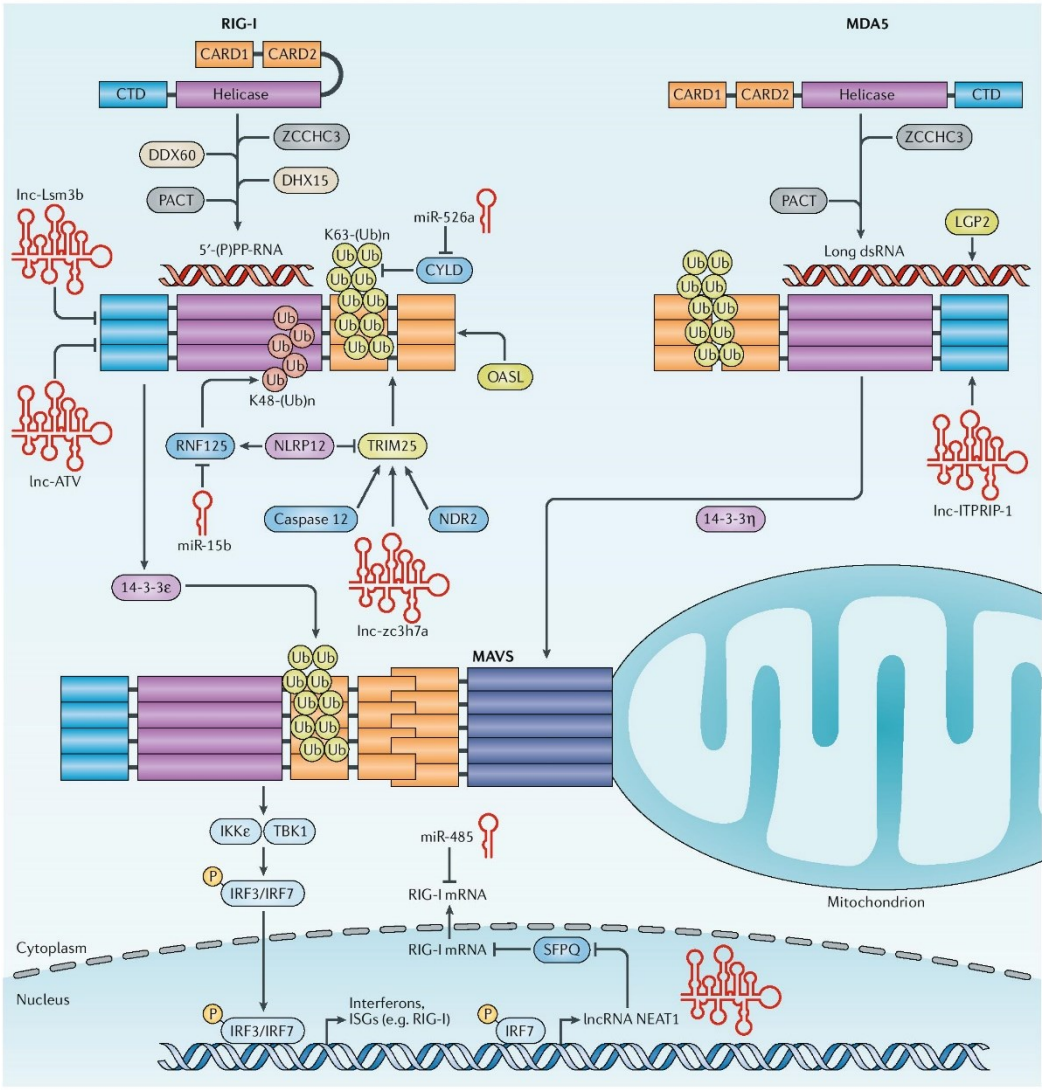


Figure 21: La voie de signalisation RIG-I / MDA5.

RIG-I et MDA5 sont d'abord activées par reconnaissance de PAMP, entraînant l'intéraction avec MAVS. Suite à l'activation de MAVS par RIG-I / MDA5, la cascade de signalisation comprend l'interaction de IKKε et TBK1, puis la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7. p-IRF3 et p-IRF7 sont transloqués dans le noyau, où ils se dimérisent et se lient aux sites de liaison des facteurs de transcription des gènes IFNα et IFNβ pour activer leurs transcriptions. L'expression de ces gènes dans le milieu cellulaire déclenche la cascade de signalisation IFN de manière autocrine ou paracrine pour induire l'expression de centaines de gènes stimulés par l'interféron (ISG) pour conférer une résistance antivirale. RIG-I et MDA5 activent également la voie NF-κB. RIG-I peut agir en amont de la voie canonique, ce qui entraîne la translocation des deux unités fonctionnelles NF-κB (p50 et p65) dans le noyau, tandis que MDA5 stimule l'expression de NF-κB indépendamment de cette voie.(239)

B. Les interférons

Les IFN sont des glycoprotéines de la famille des cytokines, des molécules de signalisation contrôlant le système immunitaire en induisant l'expression d'effecteurs

antiviraux (244,245). Ils ont été décrits en 1957 par Isaac et Lindemann. Le mot « interférons » fait référence à leur capacité d'interférer avec la réplication virale. Les interférons sont classés selon leurs propriétés et leur origine en 3 types : les IFN-1 comprenant les IFN-α et β principalement (ainsi que les IFN-ω, -ε, -τ, -δ, –κ and –o moins connus) ; les IFN de type II (IFN-2) (IFN-γ) qui sont des molécules de communication entre des cellules spécialisées du système immunitaire ; et les IFN de type III (IFN-3) (IFN-λ) impliqués dans l'immunité innée antivirale (**Figure 22**)(245).

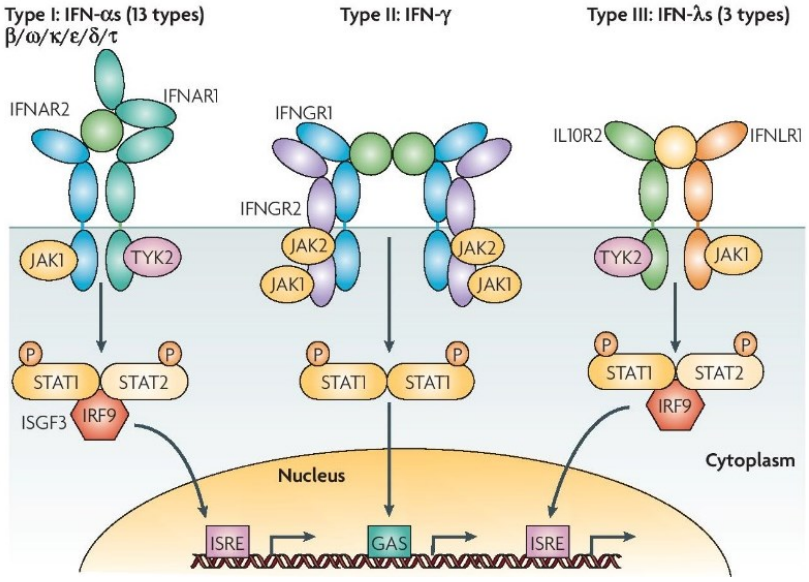


Figure 22: Les différents types d'interférons et leur voie de signalisation.

Les IFN de type I (IFN-α et IFN-β), les IFN de type II (IFN- γ) et les IFN de type III (IFN-λ) se lient respectivement aux récepteurs IFNAR1/IFNAR2, IL28Rα/IL10Rβ et IFNGR1/IFNGR2. Les IFN de type I et III activent la même voie de signalisation induisant l'expression des ISGF3 et STAT1 contrairement aux IFN de type II qui n'activent que STAT1. (IFN : Interféron ; ISRE : interferon-stimulated response element.(245)

1. Propriétés des interferons

Les acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée antivirale sont les IFN-1, divisés en plusieurs sous-types : les IFN-α (13 sous-types), les IFN-β (1 sous-type), et les IFN-ε ou IFN-ω moins étudiés et dont l'action est limitée à certains organes (244). Les IFN-1 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**)(246).

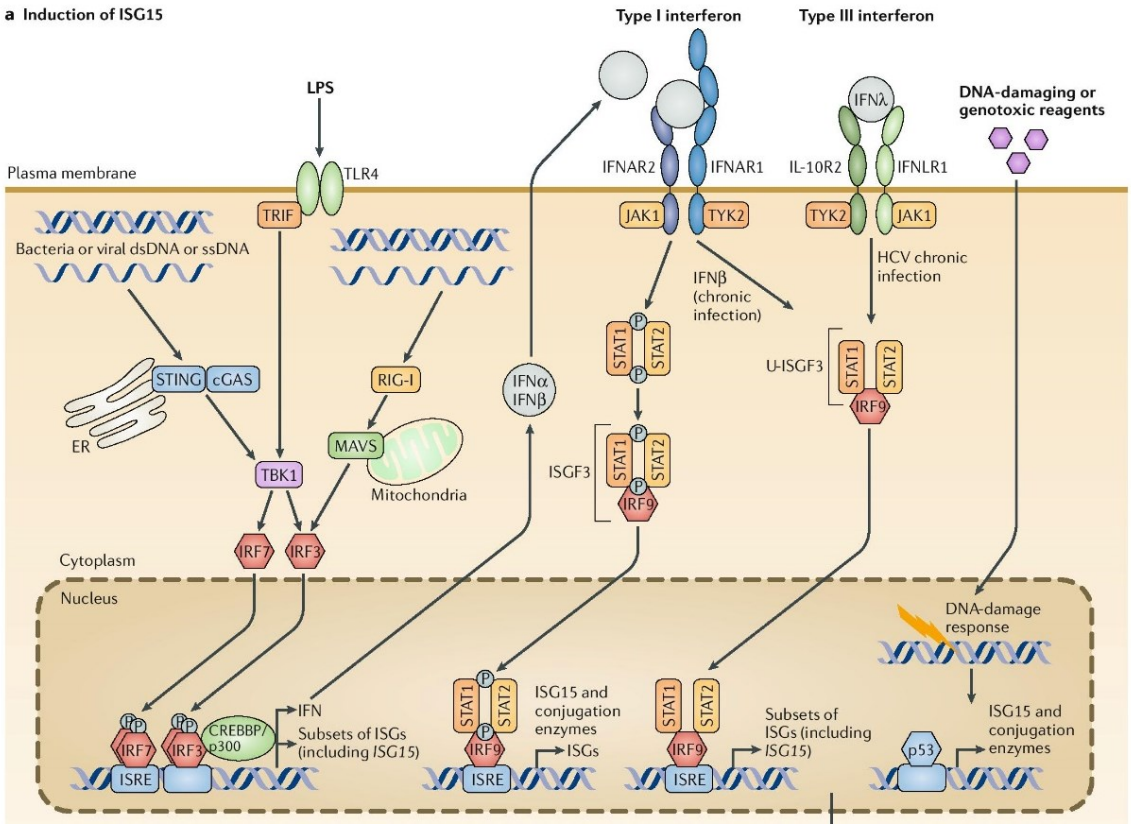


Figure 23: Production d'interféron au cours d'une infection.

Les IFN sont 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, Interferonstimulatedgenes).(246)

Parmi les IFN-2, il n'existe qu'un seul sous-type, les IFN-γ qui sont principalement sécrétés par les cellules du système immunitaire telles que les monocytes/macrophages, les cellules NK, et les lymphocytes T cytotoxiques (245). Les IFN-γ sont structurellement différents des IFN-1 et vont activer et amplifier la réponse immunitaire cellulaire par attachement à son récepteur dimérique appelé IFNGR (245).

Les IFN-3 n'ont qu'un seul sous-type, les IFN-λ (12). Décrits récemment, il comporte les IFN-λ1, λ2 et λ3, aussi nommés IL29, IL28A et IL28B (12). Ces IFN reconnaissent un récepteur qui leur est spécifique formé par l'IL10R2 (aussi nommé CRF2-4) et IFNLR1 (aussi nommé CRF2-12) (**Figure 23**)(246). Ils ont une action antivirale complémentaire à celle des IFN-1 dans les tissus les plus exposés aux infections (tube digestif, système respiratoire, etc.).

Les IFN-1 et-3 induisent des groupes de gènes similaires par des voies de signalisation identiques et aboutissent à la synthèse d'importants médiateurs de la réponse antivirale (247).

Les IFN-1 sont des effecteurs antiviraux puissants qui contribuent à la maturation des cellules dendritiques, à l'activation des cellules NK, à la production d'anticorps ainsi qu'à la différentiation des lymphocytes T cytotoxique (**Figure 24**)(248). Ils ont une fonction immuno-modulatrice en augmentant l'expression des molécules du CMH de classe I (**Figure 24**)(248).

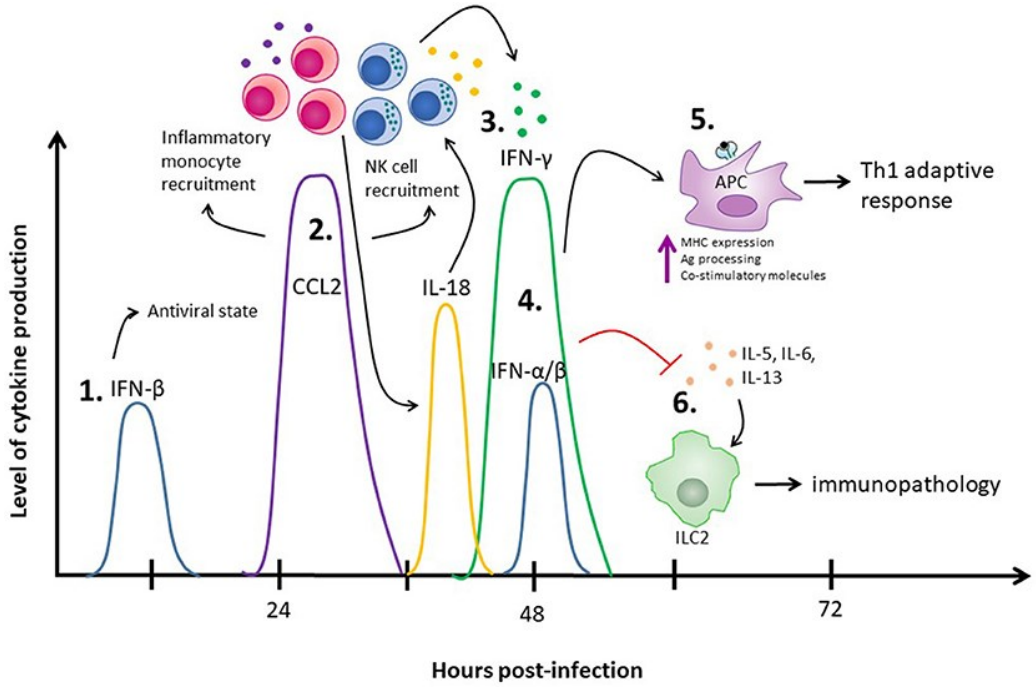


Figure 24: Rôle des IFN-1 au cours de l'infection virale.(248)

2. Induction des interférons de type 1 par les entérovirus

Au cours de la réplication des EV, l'ARN viral est présent sous plusieurs formes :1) réplicative double brin d'environ 7,5 kb, et 2) intermédiaire simple brin avec quelques segments double brin (35,249). L'inhibition de la synthèse du brin d'ARN complémentaire et des formes réplicatives diminue l'induction de la réponse immunitaire IFN-1 (α et β) (227). En revanche, une diminution des formes intermédiaires (double brins) augmente cette réponse immunitaire (227). La reconnaissance des EV par RIG-I ou MDA5 est discutée dans la littérature (221,231,250–254). Certains auteurs rapportent que MDA5 est le récepteur principal cytosolique au cours de l'infection par les EV, permettant une activation de la réponse IFN-1

in vitro et *in vivo* (221,231). Des résultats similaires ont été décrits pour les poliovirus (255). LGP2 serait également un régulateur important dans l'induction de la réponse IFN-1 par les EV (256,257). D'autres auteurs ont montré que la voie TLR3 seule était suffisante pour induire une réponse IFN-1 après une infection par le poliovirus, *in vivo*(237). Dans les cellules pancréatiques infectées par les CVB4, l'IFN-α induit les gènes codant pour la 2', 5'-oligoadénylate synthétase et la ribonucléase L (RNase), tandis que l'IFN-γ induit une protéine kinase (PKR), deux facteurs antiviraux (151,258).

Plusieurs auteurs ont montré que l'absence ou l'inhibition des IFN-1 augmentait la mortalité de l'infection par le CVB3 chez la souris (259–261). En revanche, la stimulation de cellules cardiaques par des IFN-1 inhibe la réplication virale et la production de particules virales infectieuses (262).

C. Immunité cellulaire

Au cours de la phase d'entrée du virus au niveau des sous-muqueuses digestives et respiratoires, les cellules dendritiques interviennent précocement (moins de 4 jours) dans la reconnaissance du virus (8,11,263). Elles ont un rôle essentiel en tant que cellules présentatrices d'antigène (CPA) (237,264–266). Elles sont capables d'amplifier les réponses T et B permettant d'induire une réponse immunitaire de type Th1 ou Th2 et le recrutement des cellules inflammatoires sur le site de l'infection (237,264). Une infiltration de cellules inflammatoires telles que les cellules NK et les macrophages induit une production importante de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF et l'IFN-γ qui vont limiter localement la propagation de l'infection virale dans les cellules cibles (263). Cette réponse pro-inflammatoire peut induire une clairance virale de l'organe infecté caractérisée par l'absence de virus infectieux 5 à 14 jours après la phase d'invasion (8,10). La réponse de type cellulaire avec l'activation des cellules NK, K et des macrophages est primordiale pour la clairance virale des tissus infectés et va permettre la mise en place de l'immunité adaptative (**Figure 18)**(10).

D. Immunité humorale ou adaptative

La mise en place de l'immunité à médiation humorale se fait à partir du 6ème ou 7ème jour post-infection par le recrutement de lymphocytes et la production d'anticorps neutralisants (10,125,267). Ces anticorps neutralisants sériques vont permettre de circonscrire l'infection à EV en bloquant l'infection des cellules cibles (125). 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 (8). Des antigènes viraux, et parfois cellulaires démasqués par l'infection à EV, vont également être reconnus par les lymphocytes B directement ou par les lymphocytes T par les CPA (267). Une expansion clonale des lymphocytes activés a été observée (B, T CD4+ *Helper* ou T CD8+ cytotoxiques)(237). Les éléments déterminants l'orientation (Th1 ou Th2) de cette réaction immunitaire adaptative sont peu connus : clairance virale avec une guérison, infection persistante, ou développement de pathologies auto-immunes (230).

E. Facteurs de restriction

Les facteurs de restriction intracellulaires constituent de puissantes barrières contre les virus (101,268,269). En plus d'interférer à des étapes critiques du cycle de réplication virale, certains facteurs de restriction agissent également comme des capteurs innés déclenchant des réponses innées contre les infections (268,270). Les facteurs de restriction jouent un rôle important dans l'organisation de l'immunité cellulaire antivirale.

Certains facteurs de restriction sont induits par la réponse immunitaire de type IFN, tandis que d'autres sont intrinsèques à la cellule et sont présents de manière constitutive et régulés de manière variable par les IFN (268). Ces effecteurs cellulaires intrinsèques fournissent une défense de première ligne contre les virus avant la transcription des IFN et des gènes stimulés par les IFN (ISG).

Parmi ces facteurs de restriction, le génome humain code pour une série de six enzymes mutagènes de l'ADN simple brin nommées APOBEC3 (*Apolipoprotein B mRNAediting enzyme, catalytic polypeptide-like*) qui limitent la réplication de nombreux micro-organismes,

tels que les virus (269,271–273). Cette famille de cytidine désaminases humaines (A3A-A3B, A3DE, A3F-A3H) va éditer génétiquement les résidus de cytidine de l'ADN simple brin. Lorsqu'ils sont réparés, cela se traduit par des mutations C→T dans l'ADN. Ces enzymes ciblent l'ADN viral ou mitochondrial dans le cytoplasme (A3A, A3C-A3H) ou l'ADN nucléaire lui-même (A3A, A3B)(273). Le gène A3A, contrairement aux autres membres des enzymes A3, est massivement régulé à la hausse par les IFN-1 et -2 (273).

L'enzyme A3G peut limiter l'infection de plusieurs virus, notamment le virus de l'immunodéficience humaine-1, le virus lymphotrope à cellules T humain de type 1, le virus de l'Hépatite B et le virus de l'Hépatite C (268,272,273). L'A3G inhibe la réplication rétrovirale soit par la désamination de l'ADN viral, soit par la perturbation de la retro-transcription et de l'encapsidation du génome de façon désaminase-indépendante (271). De plus, l'A3G inhibe la réplication du VHC par une interaction avec la protéine virale NS3 désaminase-indépendante (272). Li et al. ont récemment rapporté que l'A3G se lie à la 5′NC de l'EV71 pour inhiber la traduction des protéines virales et la réplication du génome (101). L'EV71 antagonise en retour la restriction d'A3G par sa protéase 2C qui induit la dégradation d'A3G (101).

AUF1 (*AU-rich binding factor 1*), une protéine cellulaire impliquée dans la stabilité de l'ARNm, se lie directement à la région 5'NC des poliovirus, des CVB3 et des Rhinovirus et inhibe la traduction virale *in vitro* (103). AUF1 peut être clivée par la protéase 3CD pour échapper à ce facteur de restriction (103).

Plusieurs ubiquitine ligases E3 ont été identifiées comme des effecteurs antiviraux intrinsèques aux cellules (102,102,254). Le plus souvent, les ligases E3 ciblent les protéines virales pour qu'elles soient dégradées par le système ubiquitine-protéasome. Par exemple, la protéine 5 contenant des motifs tripartites (TRIM5) cible la protéase du virus de l'encéphalite à tiques par un mécanisme ubiquitine-dépendant, et limite les rétrovirus des primates en se liant aux capsides virales (274). D'autres membres de la famille TRIM favorisent la dégradation des protéines non structurelles des EV, des Flavivirus, du virus de la grippe A et des rétrovirus (102,254,259,274).

En particulier, TRIM7 inhibe la réplication de l'ARN des EV (102). La protéine 2C et son précurseur, 2BC, seraient les principales protéines virales ciblées par TRIM7. Les protéines 2C et 2BC aident à remodeler les membranes de l'hôte pour former des organelles de réplication. La protéine 2C fonctionne également comme une ATPase et une hélicase d'ARN et est importante pour la réplication de l'ARN viral.

F. Echappement des entérovirus à la réponse immunitaire

La réponse immunitaire innée est essentielle pour contrôler l'infection par les EV. Afin de se répliquer et de survivre, de nombreuses espèces d'EV ont développé diverses stratégies pour échapper au système immunitaire. Ces stratégies sont discutées dans les sections suivantes et résumées dans la **figure 25 et le tableau 5** (227–229,275)**.**

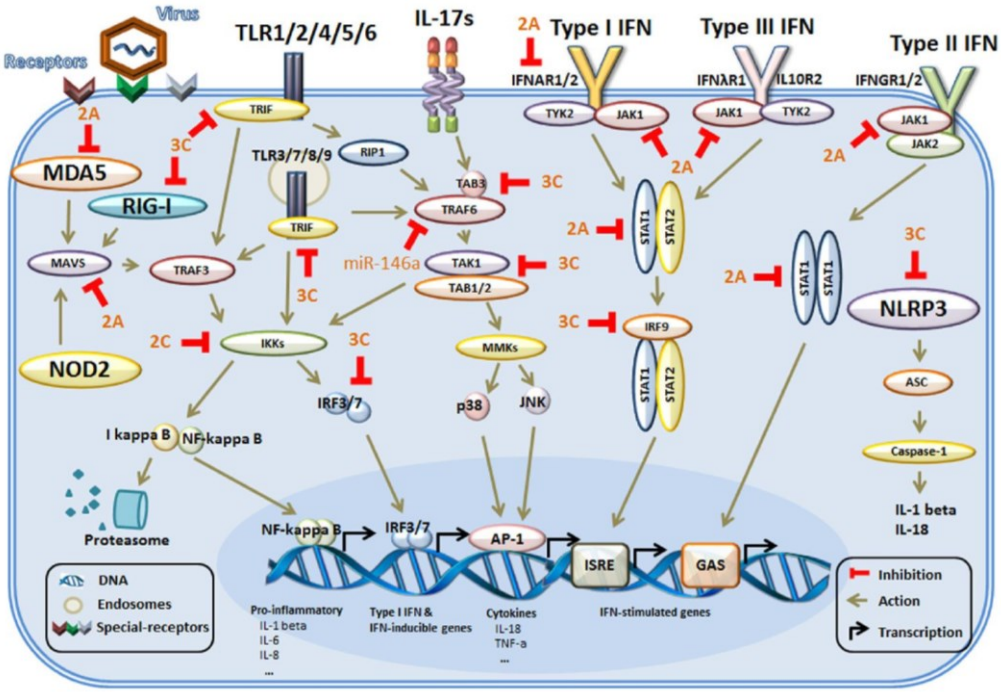


Figure 25: Schématisation des stratégies d'évasion des entérovirus dans les voies de signalisation cellulaires.

3Cpro, 2Apro et 2C sont principalement impliqués dans la régulation négative des IFN de type I, des cytokines pro-inflammatoires et des ISG à différents stades. (MDA5 : protéine associée à la différenciation du mélanome5 , RIG-I : gène 1 inductible par l'acide rétinoïque , MAVS : protéine de signalisation antivirale mitochondriale , TBK1 : kinase de liaison TANK 1, IRF3 / 7 : facteur réglementaire 3/7 d'interféron , TRIF :Interféron β induisant l'adaptateur contenant un domaine TIR , TLR : récepteurs de type péage , DAMP : modèles moléculaires associés au danger , eIFG4 : facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4G , TRAF6 : facteur 6 associé au récepteur TNF , TAK1 : facteur de croissance transformant-β kinase activée 1 , TAB2 / 3 : TGF-β Kinase activée 2/3 , IFNAR : récepteur d'interféron α / β , 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 : Interferon - élément de réponse sensible , interférons : interférons)(275)

Tableau 5: Intéractions entre les protéines virales et les effecteurs des voies de signalisation de la réponse immunitaire

Protéine cible	Protéases	Intéractions	Références
RIG-I	3C	Clivage	(227,276)
MDA5	2A / caspases	Clivage / protéasome	(227,276)
MAVS	2A / 3C / caspases	Clivage	(227,238,276)
TRIF	3C	Clivage	(227,238,277)
IRF7	3C	Clivage	(227)
IRF9	3C	Clivage	(278)
IKKβ	2C	Inhibition de la phosphorylation	(279)
P65	2C	Inhibition de l'intéraction avec P50	(280)
Complexe TAK1	3C	Clivage	(281)
IFANR1	2A	Régulation négative	(282)
G3BP1	3C	Clivage	(283)
miR-146a		Régulation positive pour inhiber IRAK1 et TRAF6	(284)
miR-526a	3C	Régulation négative	(285)

1. Modulation de la transcription et de la traduction de la cellule infectée

L'infection par les EV entraîne l'arrêt de la synthèse de l'ARN et des protéines de l'hôte (286). Dans ce processus, certaines facteurs d'initiation de la traduction eucaryote (eIF4G et AI) et la sous-unité p220 du complexe protéique de liaison de la coiffe (*cap-binding complex*, CBC) sont clivés par la protéase 2A (134,287). Le clivage de eIF4G seul n'induit que partiellement l'arrêt de la traduction (288,289). De même, le clivage de la protéine de liaison poly(A) (PABP) par la protéase 3C joue un rôle important dans l'arrêt de la traduction (289,290). L'infection par les EV peut également inhiber la transcription médiée par l'ARN polymérase II de la cellule hôte par le clivage, par la protéase 3C, de la protéine de liaison TATA (TBP) et de la protéine

contenant l'élément sensible à l'AMP cyclique (CREB)(291,292). Les EV inhibent les voies de signalisation de l'IFN, du moins en partie, par l'arrêt de la transcription et de la traduction de l'ARNm de l'hôte par les protéinases 2A et 3C (277,281,288).

2. Interférence des entérovirus avec les TLR et leur voie de signalisation

Le blocage de la voie de signalisation de TLR3 par les EV intervient au niveau de TRIF (277). Le clivage de TRIF par certaines protéases virales bloque l'activation du facteur de transcription NF-κB et la production d'IFN-1 (**Figure 25**)(238,275,277).

La protéase 3C de l'EV71, du CVB3 et de l'EV68inactive plusieurs protéines de la voie de signalisation des TLR, notamment TRIF, TAK1 et IRF7, inhibant la transcription par NF-κB et AP-1 (**Figure 25)** (238,277,281,293). L'inhibition de la transcription a pour conséquence une diminution de l'expression de nombreux gènes codant pour les protéines effectrices de l'inflammation, dont les IFN. La protéase 2C de l'EV71 inhibe la phosphorylation des intermédiaire IKKα/β, inhibant à son tour la transcription de NF-κB et IRF3/7 (281). La protéase 2C de l'EV71 fonctionne également comme un antagoniste de NF-κB (**Figure 25**)(279). L'expression d'un miARN capable d'inhiber TRAF6 est également décrite au cours de l'infection par EV71, diminuant la réponse immunitaire innée et augmentant la mortalité de l'infection *in vivo* (284). Récemment, il a été démontré que la protéine 2C des EV71, EV68 et PV inhibe également l'activation de NF-κB en interagissant avec p65(280). Cette interaction inhibe la formation de l'hétérodimère p65 et p50, le membre le plus abondant de la famille NF-κB. En résumé, ces données indiquent que les EV échappent également à l'immunité innée par le biais de la protéine 2C.

3. Interférence des entérovirus avec les RLR et leur voie de signalisation

Les EV ont développé diverses stratégies pour inhiber l'activation des RLR (275). Les EV induisent la formation d'agrégats de type granule de stress (SG) dans le cytoplasme pour

échapper à la reconnaissance par les récepteurs cytosoliques (294). La protéine virale VPg se lie à l'extrémité 5'-ppp de l'ARN viral pour bloquer sa reconnaissance par les RLR (221,250).

L'EV71, comme le rhinovirus 1, le CVB3 et le poliovirus peuvent induire le clivage du récepteur MDA5 (231,255,276). Ce clivage est principalement médié par la protéase 2A, mais également par la voie du protéasome et des caspases (**Figure 25**). Outre MDA5, RIG-I peut être clivé par certains EV, tels que CVB3 et EV71, par leur protéase 3C (254,295).

MAVS est également ciblée par plusieurs protéases des EV dont le rhinovirus 1, le CVB3 et l'EV71 par plusieurs mécanismes. Le clivage ferait intervenir la protéase 2A de l'EV71, les protéases 2A et 3C de CVB3 et, dans le cas du rhinovirus 1, la caspase 3 (**Figure 25**)(238,276,296). De plus, lors de la réplication del'EV71, les protéines virales vont induire un dysfonctionnement des mitochondries en plus du clivage de MAVS (223).

4. Interférence des entérovirus avec la voie des IFN

Après la sécrétion des IFN, ces derniers peuvent se fixer à leur récepteur spécifique membranaire pour réguler la réponse immunitaire. Notamment, l'activation de la voie de la caspase 3 par la protéase 2A de l'EV71 diminue la traduction du récepteur IFNAR, permettant l'amplification de la réponse immunitaire innée (282,297). De plus, la protéase 2A bloque la phosphorylation de JAK1, TYK2, STAT1 et STAT2, intermédiaires de la voie JAK-STAT, diminuant la signalisation immunitaire après IFNAR (**Figure 25**)(282). Le clivage des protéines IRF7 et 9 par la protéase 3C inhibe la signalisation JAK-STAT et module la transcription des gènes induits par l'IFN (292,293). Ce clivage se produit indépendamment des caspases, du protéasome, du lysosome et des activités d'autophagie (**Figure 25)**.

5. Interférence des entérovirus avec d'autres voies

Les protéines 2BC, 2C et 3A provoquent un réarrangement de l'organisation de la membrane cellulaire pour former des complexes de réplication virale, rendant les PAMP viraux inaccessibles aux récepteurs cytosoliques (37,65,292,294,298). De plus, des protéases vont

rapidement cliver certains facteurs de restrictions, tels que l'A3G (protéase 2C) ou AUF1 (protéase 3CD), pour bloquer leur fixation en région 5'NC et l'inhibition de la réplication virale (101,103).

Les EV peuvent également échapper à l'immunité innée en interférant avec d'autres voies de signalisation. Par exemple, les premiers stades d'infection par les EV induisent la formation de SG, qui ont une action antivirale et servent de médiateur à la signalisation de l'immunité innée par le biais de la protéine 1 de liaison à la protéine d'activation de la Ras-GTPase (domaine SH3) (G3BP1)(283,299). Cependant, à des stades ultérieurs de l'infection, les SG disparaissent après que la protéase 3C ait clivé G3BP1 (283). Les EV peuvent empêcher la formation des SG ou les désassembler pour contrer leur action antivirale en clivant G3BP1.

Après l'infection par l'EV71, l'inflammasome NLRP3 est activé et joue un rôle protecteur (300–302). Les protéases 2A et 3C clivent directement NLRP3 pour inhiber l'activation de l'inflammasome (302).

Les EV peuvent également moduler la réponse immunitaire innée en régulant les fonctions des miRNA, qui ont des rôles critiques dans la régulation des interactions EV-hôte. Par exemple, l'infection par l'EV71 peut diminuer la production d'IFN en induisant l'expression de miR-146a (284). Le miR-146a est un régulateur négatif de la signalisation des RLR, qui peut inhiber l'expression d'IRAK1 et de TRAF6, deux éléments majeurs dans la production d'IFN. Récemment, Xu et al. ont montré que la voie de signalisation RIG-I peut être régulée positivement par le miR-526a (285). À des stades plus tardifs de l'infection par EV71, la protéase 3C peut bloquer l'expression du miR-526a et inhiber davantage la production d'IFN. D'autres miRNA sont également impliqués dans les infections par EV, y compris par les EV71, CVB3, et les rhinovirus (303).

G. Auto-immunité

1. Cardiaque

Plusieurs études ont démontré que les auto-anticorps jouent un rôle important dans la pathogenèse de la CMD (304–306). L'inoculation d'auto-anticorps anti- translocase ATP/ADP (auto-antigène cardiaque) peut induire une myocardite et une CMD chez les souris, tandis que l'élimination des auto-anticorps par immunoadsorption ou d'autres méthodes peut améliorer la fonction cardiaque des patients atteints de myocardite et de CMD et chez la souris (304,305,307). Les auto-anticorps peuvent être produits par mimétisme moléculaire (308–310). Les protéines virales possèdent des séquences d'acides aminés homologues avec les protéines des cardiomyocytes (ou le virus et l'hôte partagent le même déterminant antigénique ou épitope) (310). L'induction d'une réponse immunitaire contre l'antigène viral conduit ainsi à une réaction croisée avec les auto-antigènes, ce qui entraîne une auto-immunité (309,310). L'infection virale peut être suivie par un processus auto-immun, notamment le recrutement de cellules auto-réactives dans le cœur, favorisant l'activation des lymphocytes B et la production d'auto-anticorps, aggravant les lésions viro-induites initiales (306,308).

De nombreux anticorps associés à la myocardite chez l'Homme ou chez la souris ont été décrits dans la littérature, dont le plus important est dirigé contre la myosine (304). La présence d'auto-anticorps dirigés spécifiquement contre la myosine cardiaque chez des souris atteintes de myocardite a été décrite pour la première fois en 1987 par Rose et al (311). Neu et al. ont rapporté que l'infection avec un CVB3 chez la souris entraîne une myocardite associée à un titre élevé d'auto-anticorps anti-myosine spécifique de l'isoforme de la myosine cardiaque (312). L'injection de myosine cardiaque elle-même dans certaines souches de souris induit également une myocardite sévère avec des titres élevés d'auto-anticorps anti-myosine cardiaque (310). Les souches de souris résistantes à la myocardite induite par la myosine cardiaque ne développent pas d'auto-anticorps anti-myosine cardiaque (310).

Chez l'Homme, l'isoforme α-myosine existe exclusivement dans les myocytes cardiaques, alors que l'isoforme β-myosine se trouve à la fois dans les myocytes cardiaques et dans les cellules musculaires squelettiques lentes (311). Pummerer et al ont cartographié les

épitopes pathogènes sur les molécules de myosine en 1996 (98). Ils ont constaté que l'α-myosine est l'isoforme immunogène dominante qui induit la myocardite (avec une sévérité et une prévalence élevées) alors que la β-myosine provoque rarement la maladie. Des auto-anticorps circulants dirigés contre des molécules entières de myosine ont été détectés chez 26 % à 46 % des patients atteints de myocardite ou de CMD (304,310).

2. Pancréatique

Concernant le DT1, une hypothèse physiopathologique est la stimulation de l'auto-immunité lors de l'infection par les EV-B, aboutissant à la destruction des cellules β pancréatiques (264,313,314). Cette hypothèse a été explorée avec du sérum et/ou des cellules T d'animaux immunisés contre des peptides synthétiques d'auto-antigènes de cellules bêta, et aussi avec du sérum et/ou des cellules T de patients diabétiques ou d'individus avec une infection à EV (122,214–216,315). Des auto-anticorps dirigés contre les îlots de Langerhans ont été détectés au cours d'infections par les EV-B (211,212). D'autres auto-antigènes sont présents chez les patients avec un DT1, tels que ceux dirigés contre la tyrosine phosphatase IA-2 ou encore la proinsuline. D'une part, la réponse immunitaire dirigée contre l'antigène viral pourrait, par réaction croisée, engendrer des lymphocytes T cytotoxiques et/ou des anticorps, capables d'attaquer le tissu pancréatique, et de participer ainsi à la pathogenèse du DT1. D'autre part, l'infection des cellules β pancréatiques par les EV-B pourrait provoquer une diffusion des épitopes cellulaires pouvant stimuler des cellules auto-réactives proches (211,313).

Le modèle le plus connu est celui de la protéase virale 2C et de la GAD65 ayant en commun une séquence d'acides aminés appelée PEVREK (224,316,317). Un phénomène de réactivité croisée a été décrit par certains auteurs. La réactivité croisée serait restreinte à certains allèles du CMH tels que HLA-DR1 (qui n'est a priori pas prédisposant au DT1) ou HLA-DR3 chez l'Homme ou chez la souris (allèles tous deux prédisposants au DT1) pour une présentation efficace de l'épitope immunogène. Un autre exemple est celui de la protéine de capside VP1 et du précurseur VP0 qui présentent une homologie avec la tyrosine phosphatase IAR/IA-2 (267,318). Une réponse immunitaire humorale et cellulaire dirigée contre la partie C-terminale de cette phosphatase a été mise en évidence. Cette région a une séquence identique de 5 acides aminés, suivie d'une analogie de 5 acides aminés avec le motif conservé dans la VP1 des EV,

qui est un épitope fortement immunogène pour les cellules B et T dans les réponses immunes induites par les infections à EV.

Les cellules bêta peuvent être la cible des lymphocytes T cytotoxiques auto-réactifs préexistants. En effet, des souris transgéniques non prédisposées au diabète, mais qui sur-expriment un récepteur de cellule T (TCR) spécifique d'un auto-antigène d'îlot, développent un diabète 2 à 4 semaines après l'inoculation de CVB4 (224,319). Dans ce modèle, l'infection à CVB4 induit l'inflammation du pancréas qui a pour effet d'activer « en passant » (effet « *bystander* ») des cellules T auto-réactives préexistantes. Chez des souris NOD, il a été montré que le CVB4 pouvait accélérer le développement spontané du diabète par un effet « *bystander* », mais seulement en présence d'un nombre suffisant de cellules T auto-réactives préexistantes (320). Il est intéressant de noter que des lymphocytes T cytotoxiques auto-réactifs dirigés contre l'antigène GAD65 des cellules bêta ont été mis en évidence dans le sang périphérique de patients diabétiques (316).

IV. Populations d'entérovirus avec ARN tronqué en région 5'non codante

A. Caractérisation des populations virales tronquées en région 5'non codante

1. Virus à ARN

Des délétions du génome viral en région 5'NC ont été décrites pour plusieurs virus à ARN : virus de la peste porcine africaine, virus de la dengue, virus de l'hépatite C… (321–324) Ces populations virales ont été souvent associées à des phénotypes moins sévères et/ou une *fitness* virale diminuée et/ou à des infections chroniques.

2. Entérovirus : *in vitro et in vivo*

La première description d'un virus de la famille des *Picornaviridae* présentant des délétions en région 5'NC remonte à 1995, dans le génome d'un aphtovirus, le *Foot and Mouth Disease Virus* (FMDV)(321). En 2005, l'équipe du Dr N.M. Chapman a mis en évidence des délétions nucléotidiques en région 5'NC dans le génome d'un EV-B, un CVB3 (22). Ces délétions n'étaient détectées qu'après des passages successifs dans des lignées de cellules quiescentes, telles que des cardiomyocytes de souris, et *in vivo* dans le cœur de souris. Des activités de réplication virale dans le cœur étaient observées jusqu'à 175 jours après la transfection de CVB3/28 avec des délétions en région 5'NC chez des souris immunocompétentes ou immunodéficientes (22). Des populations de CVB3/28 tronqués en région 5'NC ont également été détecté dans le pancréas de souris immunocompétentes (21). Les délétions étaient toujours limitées à 49 nucléotides en région 5'NC.

3. Entérovirus : chez l'Homme

En 2008, ces formes virales tronquées en région 5'NC ont été détectées dans des prélèvements de cœur d'un cas de myocardite fulminante, chez l'Homme (23). En 2016, notre équipe a mis en évidence ces populations virales tronquées en région 5'NC dans un cas de cardiomyopathie dilatée (CMD) (20). En 2019, notre groupe de recherche a montré par séquençage haut débit (NGS) que les populations virales persistantes (charge virale faible et ratios ARN(+)/ARN(-)<5) dans des explants cardiaques de CMD étaient composées d'une majorité de formes virales tronquées en 5'NC (95%) associée à une proportion minoritaire (< 5%) de formes virales complètes (24). En 2020, ces populations virales tronquées en région 5'NC ont été détectées dans une série de cas pédiatriques de septicémie à EV (19).

B. Populations virales tronquées en région 5'non codante et quasi-espèces virales

Les quasi-espèces virales sont les distributions de mutants (également appelées essaims de mutants ou nuages de mutants) qui sont générées lors de la réplication des virus à ARN et de certains virus à ADN dans les cellules et organismes infectés (**Figure 26)**(111). Le concept de quasi-espèce trouve son origine dans une théorie de l'évolution moléculaire, notamment sur la réplication des organismes à ARN et leur susceptibilité aux erreurs au cours de leur réplication (118).

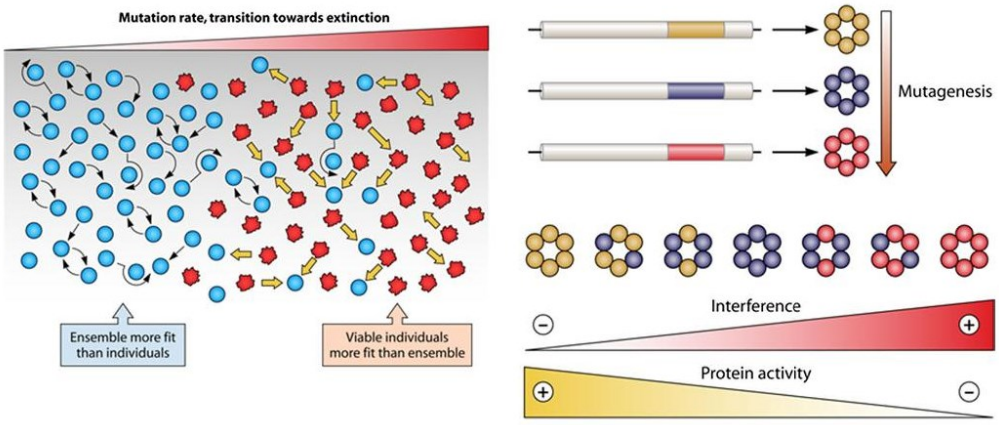


Figure 26: Représentation schématique des intéractions entre quasi-espèces virales (118).

Deux paramètres clés expliquent la formation rapide de quasi-espèces pendant la réplication virale : 1) le taux de mutations pendant la copie du génome ARN et 2) la taille du génome (111). Les taux de mutation ont été estimés comme étant de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} mutations introduites par nucléotide copié, soit près d'un million de fois plus que les taux de mutation standard opérant sur l'ADN cellulaire (118). En comparaison, le génome des virus à ARN varie entre 10^3 et 10^5 copies.

C. Pathogénicité des quasi-espèces tronquées en région 5'non codante

1. Génération de formes ARN tronquées en région 5'non codante

La région génomique tronquée est une partie du domaine I, dit en « feuille de trèfle », indispensable à la réplication des brins positifs et négatifs. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la génération de délétions en région 5'NC des EV : les erreurs de l'ARN polymérase ARN-dépendante (basse fidélité) ; l'absence de système de réparation génomique viral ; et/ou la perte du site d'initiation de la réplication en région 5'NC. Les infections persistantes à EV ont été notamment décrites dans des cardiomyocytes et des cellules β pancréatiques, deux types de cellules quiescentes (cycle cellulaire G0). En particulier, dans le pancréas de patients atteints de DT1, la VP1 est détectée dans les cellules β pancréatiques n'exprimant pas le Ki67, un marqueur de passage en cycle cellulaire (325). Ces données suggèrent fortement que des conditions cellulaires particulières des cellules quiescentes sont nécessaires pour l'infection persistante à EV, et potentiellement pour l'émergence d'une quasi-espèce ARN tronqué en région 5'NC.

La faible disponibilité des facteurs de réplication/traduction dans le cytoplasme des cellules quiescentes pourrait expliquer une initiation altérée de la réplication du brin positif (298,326,327). En effet, certaines protéines des complexes de réplication et de traduction de l'hôte sont principalement nucléaires dans les cellules en mitose, en faible concentration dans le cytoplasme (87,327). Au cours de l'infection par les EV, l'activité de la protéase virale 2A sur les nucléoporines permet le transport nucléaire vers le cytoplasme de ces facteurs de réplication (287). Les EV ont évolué pour utiliser ces protéines pour la réplication et la

traduction virales, notamment par leur fixation en région 5'NC du brin positif (287). En l'absence de mitose, ces protéines sont produites en faible quantité par les cellules.

L'initiation non optimale, par manque de facteurs de réplication, pourrait induire une fixation non spécifique de l'amorce VPg en 5' du brin positif, et donc la production de brins négatifs tronqués en 3' (22,39,326). Ces brins négatifs tronqués en 3' serviraient de matrice pour des brins positifs, eux-mêmes tronqués en région 5'. Ainsi, très rapidement au cours des cycles de réplication dans cet environnement cellulaire spécifique, des formes virales tronquées en région 5'NC pourraient émerger. Ces délétions seraient progressives de 5' en 3', jusqu'à l'impossibilité d'initier la réplication (22,326). Identifier les protéines indispensables pour l'initiation optimale du brin positif, et dont l'absence entraîne une initiation altérée, est primordial pour mieux comprendre la génération de formes ARN tronquées en région 5'NC.

Parmi les facteurs cellulaires de la réplication, hnRNP C est crucial dans l'initiation de la réplication du brin positif, au niveau des nucléotides 5-10 en région 5'NC (104). Des concentrations plus faibles de ce facteur, observées dans des cellules cardiaques notamment, pourraient entraîner une fixation de la VPg en aval des sites de fixation de hnRNP C, avec une initiation de plus en plus altérée.

2. Réplication génomique virale

Malgré les délétions en région 5'NC du brin positif, modifiant donc la séquence reconnue par l'amorce VPg pour initier la réplication, il a été démontré que la réplication des brins d'ARN tronqués en région 5'NC permet toujours la fixation de la VPg (22).

Le domaine I en « feuille de trèfle » contient un site de liaison pour la PCBP2, permettant la traduction et la réplication du brin négatif. Il existe un second site de liaison pour la PCBP2 situé aux nucléotides 90-100 (5' – 3'), sur une séquence riche en cytidine. Une perte de synthèse du brin négatif a été observée uniquement chez les mutants des deux sites de liaisons pour la PCBP2 (22,326). En utilisant des tests de traduction et de réplication *in vitro*, Lévêque et al. ont démontré une différence entre des délétions de moins 22 nucléotides, et des délétions de 50 nucléotides (326). Malgré la perte du site de liaison PCBP2 du domaine I (tige-boucle b), la majorité des EV-B tronqués en région 5'NC se réplique en culture cellulaire et produit des

protéines virales (en faible quantité) et un ARN de brin négatif (22,24). La perte du site PCBP2 du domaine I peut être compensée par la fonction de la séquence riche en cytidine, qui, étant située en aval, est conservée dans toutes les populations tronquées en région 5'NC.

La tige-boucle du domaine I est un site de liaison pour la protéine virale 3C et ses précurseurs et est impliquée dans la formation d'un complexe de réplication incluant la protéine virale 3CD (81,96,100). Il a été démontré que la mutation ou la délétion des nucléotides 48 et 49 de la feuille de trèfle diminuait la réplication de l'ARN à brin positif *in vitr o*(97). Cependant, les populations virales tronquées en région 5'NC de 50 nucléotides sont réplicatives *in vitro* et *in vivo* (22,24,326).Des délétions de plus de 50 nucléotides n'ont jamais été détectées à ce jour, il est probable que des délétions plus étendues ne permettent pas une réplication efficace. Une équipe a produit un EV-B tronqués de 78 nucléotides, soit la totalité du domaine I : bien qu'il soit réplicatif, il n'a jamais été détecté après une infection dans des modèles *in vitro* ou *in vivo* ou chez l'Homme (328). La délétion de la tige-boucle d entière (78 nucléotides) entraîne probablement des effets délétères sur la traduction et la réplication, ce qui entraîne une sélection positive des populations virales conservant la tige-boucle d.

Même si les ARN tronqués en région 5'NC ont une activité de réplication maintenue, le ratio ARN positif sur ARN négatif est diminué par rapport au ratio observé pour l'ARN complet (22,24). Un ratio ARN+/ARN- faible indique l'accumulation d'ARN négatif, matrice du brin positif, et une production de brin positif altérée. Un faible ratio ARN+/ARN- a été également caractérisé dans des infections persistantes à EV chez l'Homme et chez la souris (18).

3. Production de proteines virales

In vitro, les niveaux de traduction des EV tronqués en région 5'NC sont inférieurs à ceux du virus complet, mais détectables après un temps d'incubation prolongé (de minimum 24 heures) (22). Les délétions en région 5'NC ne modifient pas le domaine IRES situé plus en aval, et donc ne modifient pas la fixation des ribosomes cellulaires. De ce fait, les souches d'EV tronquées jusqu'à 50 nucléotides dans leur région 5'NC gardent une capacité de synthèse protéique intacte. La synthèse préservée de la protéase 2A virale diminue la production des protéines cellulaires par le clivage d'eIF4G (24).

Le clivage de l'eIF4G par la protéase virale 2A dans les cardiomyocytes humains transfectés avec un CVB3/28 tronqué de 50nt a été observé, même sans détection de la VP1 (24). Un très faible niveau de virus tronqué en région 5'NC peut donc modifier l'environnement cellulaire par une activité protéasique. Plusieurs auteurs ont montré que l'expression de la protéase 2A de CVB3, dans le cœur de souris transgéniques, induisait une cardiomyopathie (144,329). Les niveaux de protéase 2A exprimés par la population de virus tronqué en région 5'NC seraient faibles, mais pourraient être suffisant pour cliver la dystrophine, et ainsi participer à la pathogénèse de la cardiomyopathie.

L'activité des protéases virales, même faible, pourrait également diminuer de façon chronique la réponse immunitaire locale tissulaire, par le clivage des senseurs de l'immunité ou des protéines en aval.

4. Encapsidation

L'encapsidation est souvent considérée comme un processus hautement spécifique, nécessitant un signal d'encapsidation de l'ARN de polarité positif uniquement. Récemment, des auteurs ont montré que l'encapsidation de l'ARN des EV était plutôt dépendante de la dynamique de réplication (25,108). Une initiation altérée de la réplication pourrait induire l'encapsidation des brins positifs ou négatifs. Ces résultats ont également démontré qu'il n'existe pas de signal d'encapsulation de l'ARN spécifique du brin positif.

L'encapsidation de brins d'ARN négatifs produirait des virions non infectieux, ne pouvant pas se répliquer seul dans une cellule nouvellement infectée. En revanche, le transport de cellules en cellules par le biais de vésicules extracellulaires, pourrait amener suffisamment de matériel viral génomique et antigénomique pour initier une réplication efficace, même avec des virus tronqués en région 5'NC.

5. Coopération des quasi-espèces d'entérovirus

La présence d'ARN tronqué en région 5'NC réduit significativement les niveaux de réplication de l'ARN viral complet, lorsqu'ils sont transfectés ensemble *in vitro* (19,22,326). Ainsi les ARN tronqués en région 5'NC pourraient interférer avec la réplication et la traduction des génomes complets. Chez l'Homme, plus la proportion de formes virales tronquées est élevée, plus la charge virale est faible, indiquant un potentiel mécanisme d'interférence (19,24).

Contrairement aux génomes viraux défectueux (DVG), les populations virales tronquées en région 5'NC ont une activité de réplication indépendante des virus parentaux (25,330). L'interférence pourrait être la conséquence d'une compétition pour certains facteurs cellulaires de l'hôte ou des ribosomes, lorsque les formes virales tronquées sont majoritaires. Il a notamment été démontré que, dans des cellules HeLa, après co-transfection, les CVB3/28 tronqués de 50nt en région 5'NC limitaient la réplication du CVB3/28 de type sauvage (24). Dans ce système, la réplication des ARN complets étant optimale (cellule en cycle cellulaire), l'ajout de populations virales tronquées en grande quantité pourrait interférer par capture des facteurs cellulaires ou viraux de réplication.

In vivo, dans de nombreux tissus, il existe des cellules dont le cycle cellulaire peut être arrêté de façon transitoire. L'émergence de populations virales tronquées en région 5'NC dans cet environnement cellulaire permettrait en théorie une expression initiale des protéines virales, en particulier des protéases. Cette activité protéasique pourrait induire un transfert des facteurs cellulaires du noyau vers le cytoplasme, un passage en cycle cellulaire, et une réplication du virus complet. Il a en effet été démontré que la traduction du brin positif peut se produire, même dans un environnement cellulaire où la réplication est impossible de façon transitoire (25,331). Cette expression de protéines virales permettrait de produire un environnement cellulaire plus propice à la réplication de l'ARN viral.

D. Quasi-espèces tronquées en région 5’non codante et immunité antivirale

1. Senseurs de l’immunité innée

Les délétions nucléotidiques dans la région 5’NC peuvent modifier les éléments structuraux secondaires de l’ARN des EV-B qui sont spécifiquement reconnus par les senseurs de l’immunité cellulaire, en particulier les récepteurs RIG-I et MDA5 appartenant à la famille des RLR (221,232,332). La modulation de la réponse inflammatoire par les formes complètes et tronquées en région 5’NC pourrait impacter la sévérité des lésions cardiaques viro-induites à la phase aiguë. Hyde et al. ont démontré que des mutations dans la région 5’NC des alphavirus, affectant les éléments structuraux secondaires de leurs ARN, modifient la liaison et les fonctions des protéines stimulées par l’IFN (333). Il a été 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-1 ainsi que de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par la voie de signalisation de RIG-I (251). De plus, Feng et al. ont démontré que des formes réplicatives d'ARN double brin d’EV-B étaient reconnues par MDA5 et entraînaient une réponse IFN-1 significative dans des cellules humaines et murines en culture (250). Les délétions dans la région 5'NC des EV-B pourraient donc modifier les éléments structuraux secondaires de l'ARN reconnus par les senseurs immunitaires cytoplasmiques, tels que RIG-I ou MDA5. En conséquence, la régulation de cette voie d’induction des IFN-1 par les EV-B pourrait participer à un mécanisme d’échappement à la réponse immunitaire innée de l’hôte.

Les formes virales tronquées en région 5’NC conservent une activité de traduction des protéines virales, incluant les activités protéolytiques. Certaines protéases virales sont notamment connues pour cliver des effecteurs des voies de signalisation de la réponse immunitaire. Cette activité de clivage pourrait être suffisante pour limiter la réponse immunitaire au cours de l’infection fulminante.

Récemment, notre équipe a démontré que l’expression des ARNm d’IFN-β variait en fonction des proportions de populations virales tronquées ou complètes, dans des cas de septicémies à EV-B chez l’enfant (19). Ces résultats suggèrent que ces quasi-espèces ont non

seulement un impact sur la « *fitness* » virale, mais également sur la réponse immunitaire innée antivirale.

2. Facteurs de restriction

Les facteurs de restriction intracellulaires constituent de puissantes barrières contre les virus (270–272). Les facteurs de restriction jouent un rôle important dans l'organisation de l'immunité cellulaire antivirale, avec une expression tissu-dépendante. Li et al. ont récemment démontré que l'enzyme A3G (APOBEC3G) se lie à la région 5'NC de EV71 pour inhiber la traduction des protéines virales et la réplication du génome. AUF1 (*AU-rich binding factor 1*), une protéine cellulaire impliquée dans la stabilité de l'ARNm, peut se fixer directement à la région 5'NC des poliovirus, des CVB3 et des rhinovirus et inhiber la traduction virale *in vitro* (101,103). Les populations virales tronquées en région 5'NC pourraient donc acquérir un avantage réplicatif par rapport aux formes complètes, en perdant les sites de liaison de certains facteurs de restriction.

3. Auto-immunité

De nombreux auteurs ont montré que l'auto-immunité et le mimétisme moléculaire virale étaient importants dans l'évolution de la pathologie cardiaque et pancréatique au cours de la persistance des EV (306,310). La persistance de populations d'EV tronquées en région 5'NC pourrait participer à ces mécanismes, en induisant une inflammation chronique à bas bruit, ainsi que la présentation d'antigènes viraux présents en faible concentration. Le faible nombre de cellules infectées exprimant des protéines virales de capsides permettrait d'éviter une clairance virale totale, en limitant la lyse cellulaire et la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire.

4. Vaccination

Les populations d'EV tronqués en région 5'NC participeraient au développement d'une infection persistante, pouvant être réactivée par recombinaison ultérieurement. La vaccination, à la fois en empêchant les primo-infections et les sur-infections, pourrait donc prévenir de nombreuses pathologies induites par les EV, dont l'émergence et le maintien de ces populations virales de persistance.

Cependant, si l'infection persistante par les EV est possible, cela suggère que la réponse immunitaire adaptative, médiée par les anticorps, est insuffisante pour obtenir une clairance virale. Un vaccin devra donc induire une réponse anticorps plus importante qu'une infection naturelle, et cibler plusieurs souches d'EV.

5. Traitement

Des inhibiteurs des protéases 2A et 3C, de la polymérase 2C, ainsi que des molécules empêchant la formation d'une capside ont été développés. Concernant les EV tronqués en région 5'NC, les faibles niveaux d'encapsidation et de réplication suggèrent que les traitements ciblant ces étapes seront peu efficaces.

Chez des patients atteints de CMD induite par une infection à EV, un traitement par Interféron Bêta a permis d'obtenir une clairance virale, et une amélioration de la fonction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG)(334–336).Avant de pouvoir envisager des traitements curatifs, il faudra établir une stratégie de dépistage : or, la faible charge virale et les sites de réplication profond (cœur, pancréas, système nerveux) rendent ce diagnostic difficile. Cette difficulté à diagnostiquer les infections persistantes à EV a ralenti fortement le développement de traitements. Des travaux récents de notre équipe ont montré qu'il était possible de détecter des EV tronqués en région 5'NC dans le sang au cours d'infection systémique aigue (19,162). Le développement de biomarqueurs au stade chronique de l'infection est indispensable avant le développement d'éventuels traitements spécifiques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Notre travail de recherche expérimentale a eu pour objectifs :

1- Déterminer la dynamique d'émergence des populations de virus Coxsackie-B3 tronquées dans le domaine I de l'ARN génomique et leur impact sur le profil de la réponse inflammatoire et les lésions histologiques dans les organes cibles chez la souris ;

2- Déterminer le rôle des populations d'EV-B tronquées en région 5'NC sur le métabolisme insulinique chez la souris DBA/2J et dans la cellule bêta pancréatique de rongeur.

3- Déterminer le rôle des populations d'EV-B tronquées en région 5'NC sur la réponse IFN-1 chez la souris DBA/2J et dans la cellule cible cardiaque humaine.

Ces travaux ont fait l'objet de trois articles (deux publiés et un manuscrit en préparation) présentés dans cette partie.

Article 1 : Early Emergence of 5′ Terminally Deleted Coxsackievirus-B3 RNA Forms Is Associated with Acute and Persistent Infections in Mouse Target Tissues

Au cours de l'infection systémique à CVB3/28 chez la souris DBA/2J, notre travail a consisté à : (i) identifier les organes cibles présentant une infection aigue puis persistante ; (ii) étudier la dynamique d'émergence des formes tronquées en région 5'NC de CVB3/28 naturellement produites au cours de l'infection ; (iii) établir les profils de la réponse inflammatoire dans les tissues cibles après l'infection (IL-10, MCP1, TNF-α, et IFN-β) ; (iv) étudier les lésions histologiques aigues et chroniques, en lien avec l'émergence et le maintien des populations virales tronquées en région 5'NC, et les dysfonctions des cellules spécialisées des organes cibles.

En utilisant une RACE-PCR couplée à une micro-électrophorèse, nous avons montré une émergence précoce (3 jours après l'infection) de populations virales tronquées en région 5'NC et associées à des formes ARN complet. Des activités de réplication virale avec production de particules infectieuses étaient associées à des lésions inflammatoires aiguës au niveau du cœur, du foie et du pancréas, alors qu'une clairance virale a été observée dans les autres organes. Vingt-huit jours après inoculation, nous avons décrit une infection persistante dans le cœur et le pancréas, caractérisée par de faibles niveaux d'ARN viral, des ratios ARN+/- <5 et par l'expression de la protéine de capside VP1. Cette infection persistante était associée à une dégradation de la dystrophine dans le cœur et à une diminution de l'expression de l'insuline dans le pancréas. Ces résultats ont démontré que les formes majoritaires d'ARN tronquées de 50 nucléotides des EV-B peuvent être sélectionnées précocement au cours de l'infection systémique et que leur maintien dans certains organes peut conduire à des infections aiguës et persistantes avec des dysfonctionnements des cellules cibles.

En conclusion, nos résultats expérimentaux montrent que l'émergence précoce des populations de CVB3 tronquées dans le domaine I de l'ARN génomique ont un impact sur la réponse inflammatoire et les lésions histologiques dans les organes cibles chez la souris.

vaccines

MDPI

Article

Early Emergence of 5′ Terminally Deleted Coxsackievirus-B3 RNA Forms Is Associated with Acute and Persistent Infections in Mouse Target Tissues

Domitille Callon [1,2], Anne-Laure Lebreil [1], Nicole Bouland [3], Caroline Fichel [3], Paul Fornès [1,2], Laurent Andreoletti [1,4,†] and Fatma Berri [1,*,†]

[1] Cardiovir EA-4684, UFR Médecine, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France; dcallon@chu-reims.fr (D.C.); anne-laure.lebreil@univ-reims.fr (A.-L.L.); pfornes@chu-reims.fr (P.F.); landreoletti@chu-reims.fr (L.A.)
[2] Pathology Department, CHU Reims, Hôpital Robert Debré, 51100 Reims, France
[3] Laboratoire d'Anatomie Pathologique, UFR Médecine, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France; nicole.bouland@univ-reims.fr (N.B.); caroline.fichel@univ-reims.fr (C.F.)
[4] Virology Department, CHU Reims, Hôpital Robert Debré, 51100 Reims, France
* Correspondence: fatma.berri@univ-reims.fr
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Major EV-B populations characterized by 5′ terminal deletions (5′TD) have been shown to be associated with the development of myocarditis and type 1 diabetes in mice or humans. To date, the dynamics of EV-B 5′TD-RNA forms' emergence during the course of infection and their impact on cellular functions remain unclear. Using a RACE-PCR approach in CVB3/28-infected mouse organs, we showed an early (3 days post infection, DPI) emergence of major 5′TD populations associated with minor full-length RNA forms. Viral replication activities with infectious particle production were associated with heart, liver, and pancreas acute inflammatory lesions, whereas clearance of viral RNA without organ lesions was observed in the brain, lung, intestines, and muscles from 3 to 7 DPI. At 28 DPI, low viral RNA levels, +/-RNA ratios < 5 associated with viral protein 1 expression revealed a persistent infection in the heart and pancreas. This persistent infection was characterized by molecular detection of only 5′TD RNA forms that were associated with dystrophin cleavage in the heart and insulin production impairment in beta-pancreatic cells. These results demonstrated that major EV-B 5′TD RNA forms can be early selected during systemic infection and that their maintenance may drive EV-induced acute and persistent infections with target cell dysfunctions.

Keywords: enterovirus; persistent; DBA/2J mouse; 5′ terminal genomic deletion

check for updates

Citation: Callon, D.; Lebreil, A.-L.; Bouland, N.; Fichel, C.; Fornès, P.; Andreoletti, L.; Berri, F. Early Emergence of 5′ Terminally Deleted Coxsackievirus-B3 RNA Forms Is Associated with Acute and Persistent Infections in Mouse Target Tissues. *Vaccines* **2022**, *10*, 1203. https://doi.org/10.3390/vaccines10081203

Academic Editor: Antonella Caputo

Received: 25 May 2022
Accepted: 26 July 2022
Published: 28 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Group-B enteroviruses (EV-B) are ubiquitous human pathogens transmitted through fecal–oral or respiratory routes. Although most EV-B infections remain asymptomatic, group B coxsackieviruses (CVB) serotypes 1–6 are recognized as common causes of severe acute infection in children and young adults, such as myocarditis, pancreatitis, hepatitis, or meningitis [1]. CVB belong to the genus enterovirus of the family Picornaviridae. Acute EV-B infections can evolve toward persistent infections such as dilated cardiomyopathy (DCM), type 1 diabetes (T1D), and inflammatory myopathy [2–4].

EV-B are non-enveloped viruses, with a single-stranded positive-sense RNA genome of approximately 7400 nucleotides [1]. The EV-B RNA genome is flanked at the 5′ end by a highly conserved untranslated region (5′UTR) which is crucial for the initiation of the viral replication and translation activities [1]. In 2008, a coxsackievirus-B2 harboring 5′ terminally deleted (5′TD) populations ranging from 22 to 36 nucleotides was found in the heart of a patient who died of myocarditis [5]. In 2016, Bouin et al. identified by next-generation sequencing (NGS) a majority (99%) of EV-B forms with 5′ end deletions ranging from 15

to 48 nt associated with low proportions (1%) of full-length RNA forms in heart biopsies of a patient with DCM [6]. In 2019, these results were confirmed by NGS in explanted hearts from a cohort of DCM patients [7]. Similarly, in 2005, major 5′TD populations have been found in persistent cardiac infection induced by a cardiovirulent CVB3 strain in a mouse model [8]. These EV-B 5′TD populations were characterized by low ratios of genomic to antigenomic [(+)/(−)] RNA, low production of virions, and low translation activities [6,7,9,10]. EV-B 5′TD populations with 5′ terminal genomic deletions from 8 to 50 nucleotides were found using NGS [7]. Recently, proportions of EV-B 5′TD populations with deletions of 37 to 50 nucleotides have been shown to be negatively correlated with interferon (IFN) expression in peripheral blood of patients with acute myocarditis [11]. By contrast, proportions of the full-length genome or viral RNA forms with deletions of less than 36 nucleotides were positively correlated with IFN expression [11]. In addition, EV-B 5′TD population has also been detected in the murine pancreas at a chronic stage of infection without any detectable cytopathic effect using classical culture assays [3]. Taken together, these findings indicate that EV-B populations characterized by 5′TD ranging up to 50 nucleotides were associated with the development of acute and chronic myocarditis and T1D in mice models or humans [3,7,8]. Moreover, these studies suggested that these EV-B 5′TD forms, similarly to quasi-species, could be early generated and selected during natural infection, and that the emergence of these low-level replicating 5′TD populations may explain how the virus can persist in tissues long after the acute infection leading to chronic pathologies. Indeed, viral proteases have been shown to remain functional even in EV-B 5′TD infected tissues or cells [7,12]. To date, the dynamics of EV-B 5′TD-RNA forms' emergence during systemic infection and their impact on pathophysiology remain to be investigated.

The 5′ end deletions of EV-B forms have been reported to modify functional secondary structural elements of the RNA domain I (cloverleaf) [8,9,13]. Leveque et al. demonstrated the reduced genomic replicative capacity of these EV-B 5′TD RNA forms which was explained by a disturbed binding of cellular factor PCBP2 (Poly(rC)-binding protein 2) and viral factor 3CD pro (polymerase 3CD) on the 5′UTR domain I secondary structure [9]. EV-B 5′UTR has been shown to be an immunomodulatory element, recognized by RIG-I-like receptors (RLR) [14,15]. Moreover, EV-B 5′UTR has been shown to be a fixation site for the multiple restriction factor of viral replication [16–18]. The EV-B with deletions into the 5′UTR could gain a replicative advantage over full-length forms, by the loss of RLR sensing and/or restriction factors fixation sites. Thus, a low IFN response associated with low replicative activities could explain how the virus is detected long after the infection. To date, the impact of EV-B 5′TD RNA forms on inflammatory response profile and more specifically type 1 IFN induction in target tissues remains to be investigated during EV-B acute infection.

In the present study, we investigated the dynamics of the natural emergence of EV-B 5′TD populations and related inflammatory response profiles (interleukin-10/IL-10, monocyte chemoattractant protein/MCP1, tumor necrosis factor/TNF-α, and IFN-β) during a CVB3/28-induced systemic infection in a previously described DBA/2J model. Using this experimental approach, we analyzed the impact of EV-B 5′TD population emergence and maintenance on inflammatory response profiles, histological lesions, and specialized cell functions in target organs.

2. Materials and Methods

2.1. Cells, Virus Strain, and Reagents

Hela cells were grown in minimum essential media (MEM), supplemented by 5 mL penicillin-streptomycin (PS) (Gibco®, Paris, France), 5 mL L-Glutamine and 10% Fetal Bovine serum (FBS) (Thermo Fisher®, Illkirch-Graffenstaden, France) per 500 mL. The CVB3/28 virus strain was a gift from Steven Stracy (University of Nebraska–Lincoln, Lincoln, NE, USA) [19]. IL-10, MCP1 and TNF-α were purchased from R&D Systems® (Minneapolis, MN, USA).

2.2. Virus Production and Titration

Hela cells were seeded at 0.8×10^6 cells per well of tissue culture platelet (six wells) and then incubated at 37 °C overnight. The next day, cell confluence was evaluated at 1.5×10^6 cells per well, based on previous experience; cells were then infected with CVB3/28 at a multiplicity of infection (MOI) of 10^{-3} in free-serum MEM. After 48 h post infection, the supernatant was collected and then clarified using low-speed centrifugation. Virus particles were then measured by plaque-forming unit assay (PFU). Briefly, Hela cells were infected with CVB3/28, making serial dilutions, for 1 h at 37 °C. After viral adsorption, the inoculum was harvested, and cells were overlaid with a medium containing 2% agarose and incubated at 37 °C. After 72 h post infection, viral plaques were visualized using bromophenol blue staining. The viral titers were expressed as plaque-forming unite per 1 mL (PFU/mL).

2.3. Ethic Statement

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

2.4. Infection of Mice

Five-week-old male DBA/2J mice were purchased from Charles River laboratory® (Lyon, France) and housed under pathogen-free conditions. Mice were infected intraperitoneally with 10^6 PFU/mice in 150µL of physiological serum (saline); uninfected mice were inoculated with 150µL of physiological serum (saline). EV natural infection occurs by oral or nasal routes in a human. For this experimental model, we used an intraperitoneal route to avoid variation in the viral inoculum. To determine survival rates upon infection, loss of body weight was monitored daily for 28 days post infection, and mice were euthanized if they had $\geq$20% loss of their initial body weight, according to our protocol. Mice were euthanized by cervical dislocation before organ collection at various pre-fixed times post infection (3, 7, and 28 days post infection, DPI).

2.5. Histology and Immunohistochemistry Assays

Infected or uninfected mice were sacrificed at the indicated times. A complete autopsy was performed and organs including the heart, pancreas, liver, brain, lungs, intestines, spleen, and muscles were taken and fixed in formaldehyde 4% for histology. Hearts were sliced into three transverse biventricular sections as recommended for the diagnosis of myocarditis [20]. For each sample, four-µm-thick paraffin sections were cut at three levels. The slides were stained with Hematoxylin, Eosin, and Safran (HES, Pathology department, Reims, France). The slides were examined by a pathologist for cellular infiltration, fibrosis, and necrosis. The lesions were graded using a scale of 0 (no necrosis, inflammation, or fibrosis), 1 (1 or 2 foci by slice), 2 (1 or 2 foci on every slice), and 3 (more than 2 foci on every slice) [21]. In addition, immunostaining was performed for CD3 (1/1000; Dako, Santa Clara, CA, USA, A0452), CD68 (1/100; Dako, M0814), and VP1 (1/1000; Dako, 5D8/1) as previously described [22,23]. 1:200 diluted rabbit anti-insulin (ABclonal, Woburn, MA, USA, A2090), 1:300 diluted rabbit anti-dystrophin (Abcam, Cambridge, UK, ab15277), and 1:500 diluted mouse anti-viral protein 1 (VP1; Dako, 5D8/1) antibodies were used for immunofluorescence staining of fixed heart and pancreas tissue sections. Secondary antibodies were conjugated with AlexaFluor514 and AlexaFluor633 (Thermo Fisher). DAPI (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to stain cell nuclei. Confocal images were acquired using a Zeiss confocal microscope.

2.6. Total RNA Isolation and qRT-PCR

The homogenized organs were subjected to digestion with proteinase K (Merck®, St. Louis, MO, USA). Total RNA was isolated with TRIzol RNA Isolation Reagents® (Thermo Fisher®) method according to the manufacturer's instructions. RNA were stored at −80 °C. The viral RNA copy number was quantified by quantitative-RT–PCR with a StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific®) as described previously, using primers amplifying the CVB3/28: sense (5′-CAC ACT CCG ATC AAC AGT CA-3′), antisense (5′-GAA CGC TTT CTC CTT CAA CC-3′), and probe FAM/TAMRA (5′-CGT GGC ACA CCA GCC ATG TTT-3′) (Eurogentec®, Seraing, Belgium) [24]. Viral load was expressed as genome copies per microgram (gc/µg) of nucleic acid extracted. PCR and gel migration were performed as previously described [5,8], using primers amplifying 5′end: S1entB: TTA AAA CAG CCT GTG GGT TGT TCC C; Ext2: GGT TGA TCC CAC CCA CAG G; Ext3: CAT TGG GCG CTA GCA CTC TG. The primer S1entB binds full-length forms. Primers Ext2 and Ext3 bind to 5′ end 15 to 34 nt and to 5′ end 37 to 57 nt (Figure S2).

2.7. Positive- and Negative-Strand RNA Ratio

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

2.8. Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR (RACE PCR)

Viral RNA (200 ng) was reverse transcribed using a Superscript II kit (Invitrogen, Thermo Fisher®) with 400 nM AvCRev and was incubated for 5 min at 65 °C and then 5 min on ice. The 5′ extremity of cDNA was then ligated with 1× T4 DNA ligase buffer (Ambion, Thermo Fisher®), 50 nM Trp1 DNA adaptor, 5 units of Ambion® T4 DNA Ligase (Ambion, Thermo Fisher®) was added to the cDNA-mix and was incubated 24 h at 16 °C [6]. Positive cDNA was amplified by a classical PCR reaction using a KAPA Taq polymerase kit consisting of 1× KAPA TaqA buffer, 200 µM dNTP, 400 nM AvCRev, 400 nM Trp1, and 1U KAPA Taq polymerase in a mix of 25 µL with a cycling process composed of one cycle for 3 min at 95 °C, 40 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 55 °C, 30 s at 72 °C, finishing in a cycle of 30 s at 72 °C. A 2% agarose gel electrophoresis was performed in order to control the length of the PCR products. Amplicons were then sized and quantified by bioanalyzer high sensitivity DNA analyses using the Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent®, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Viral populations deleted from less than 8 nucleotides were considered full-length viral populations since the micro-electrophoresis assay has a 10% error occurrence. We used control RNA (synthetic full length or 5′ terminally deleted forms) as a quality check for each run (Figure S2).

2.9. Cytokines Quantification

Organs of euthanized mice were harvested, at the indicated times post infection, homogenized in 600 µL of PBS solution with TissueLyser LT (QIAGEN®, Hilden, Allemagne), and centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant was used for: (1) measurement of cytokines by Enzyme-Linked Immunosorbent assay (R&D Systems®), (2) virus particles determination as described above. Viral titers were expressed as a plaque-forming unit per mg of total protein (PFU/mg). Measurement of total protein concentration in each supernatant was performed by the Bicinchoninate Acid Method (Sigma Aldrich®) according to the manufacturer's instructions. Cytokine protein level was expressed as pg or ng/mg of total protein by calculating the ratio cytokine concentration/total protein concentration.

2.10. Statistical Analysis

The Mann–Whitney or two-way ANOVA tests were used. Linear regression and Pearson R coefficient were performed. The number (*n*) of animals used in the experiment is specified in the figure legend. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 (Prism®, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Identification of DBA/2J Mice Target Tissues with Natural CVB3/28 Acute and Persistent Infections

First, we identified target tissues in which an intraperitoneal CVB3/28 infection induced an acute followed by a persistent infection, in DBA/2J mice (Figure 1). DBA/2J mice were chosen for our experiment since CVB3/28 persistence has been reported, and it is a known immunocompetent model for cardiovascular research [22]. During the course of acute CVB3/28 infection (3–7 days post infection, DPI) and at the chronic stage (28 DPI) of viral infection, viral total RNA levels, +/− RNA ratios, viral titers, and VP1 expression were assessed in a large panel of viral target tissues. Total RNA viral loads, VP1 expression, and infectious particle production were maintained at 7 DPI only in the heart, pancreas, and liver, demonstrating an acute infection phase (Figure 1A–D). In other organs, only low levels of viral RNA were observed until 7 DPI, followed by a total clearance of viral markers at 28 DPI (Figure 1A–D). At 28 DPI, low viral RNA levels, +/− RNA ratios < 5 associated with VP1 expression revealed a persistent infection in the heart, pancreas, and liver (Figure 1A–D). Finally, an acute followed by a persistent CVB3/28 infection was observed only in the heart, pancreas, and liver. By contrast, only low levels of viral genomic replication activities were observed in the brain, intestine, muscle, and lung (Figure 1A–D).

3.2. Dynamics of Emergence of 5′TD Viral Populations in Organs of Mice Infected by CVB3/28 Strain

To determine the dynamics of the emergence of 5′TD viral populations in organs of CVB3/28-infected mice, we quantified the number of genome copies of each 5′TD and full-length (FL) viral population at different DPI using a previously validated RACE-PCR approach (Figure S2 and Figure 2) [6,11]. Early after the infection (3 DPI), two groups of 5′TD viral forms were characterized: one with deletions ranging from 8 to 36 nucleotides (nt), with the loss of stem a and stem-loop b; and one with deletions ranging from 37 to 50 nt, with the loss of stem-loops a, b, and c of the cloverleaf RNA secondary structures (Figure 2A). Interestingly, these two 5′TD viral populations emerged in all organs during the acute infection phase (3 to 7 DPI) but remained detectable only in the heart, pancreas, liver, and spleen at the chronic stage of infection (28 DPI) (Figure 2B–D). In these organs, we observed a majority of 37 to 50 nt EV-B 5′TD populations with significant viral load means above 10^3 gc/µg of total nucleic acid extracted until 28 DPI (Figure 2B–D). By contrast, in other organs (brain, intestine, lung, and muscle), we observed an emergence of the same 5′ TD RNA forms without maintenance in these tissues between 3 and 7 DPI (Figure 2C,D). Our results evidenced the early emergence and maintenance of major EV-B 5′TD populations (8 to 36 and 37 to 50 nt 5′ TD RNA forms) during acute and chronic infection phases, without FL RNA forms at 28 DPI only in the heart, pancreas, and liver.

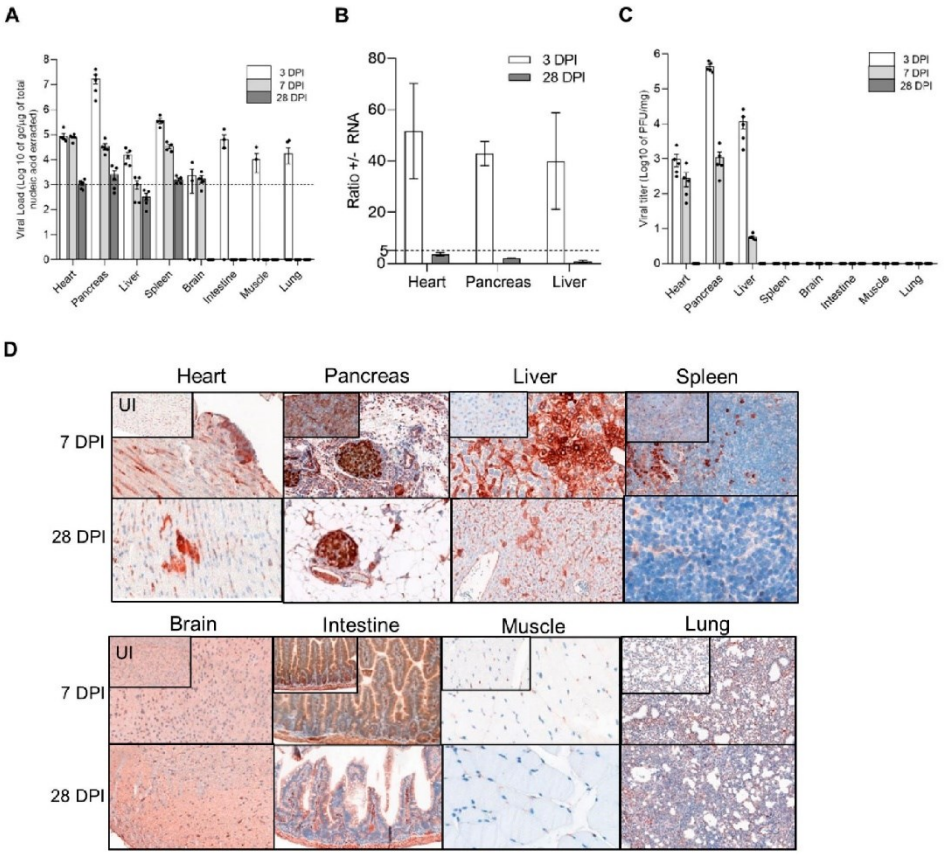


Figure 1. CVB3/28 replication and protein synthesis activities in DBA/2J mouse organs. (**A**) Viral loads were quantified in organs of CVB3/28-infected DBA/2J mice by classic RT-qPCR assay ($n = 6$). Dotted line represents the significance threshold of 10^3 genome copy (gc)/microgram of nucleic acid extracted (Figure S1). Data represent mean +/− standard error of the mean (SEM). (**B**) Positive to negative RNA ratio (+/− RNA ratio) in the heart, pancreas, and liver at 3 and 28 DPI. Dotted line represents the threshold for viral persistence ($n = 3$). (**C**) Viral titers were measured in organs of CVB3/28-infected DBA/2J mice by classic plaque forming unit assay ($n = 5$). (**D**) VP1 was detected at 7 DPI and 28 DPI in cardiac cells, Langerhans islets cells, and hepatocytes. VP1 was found sparsely positive in the spleen at 7 DPI. Other organs were negative for VP1. Original magnification: 400×. DPI: Days Post Infection. UI: Uninfected.

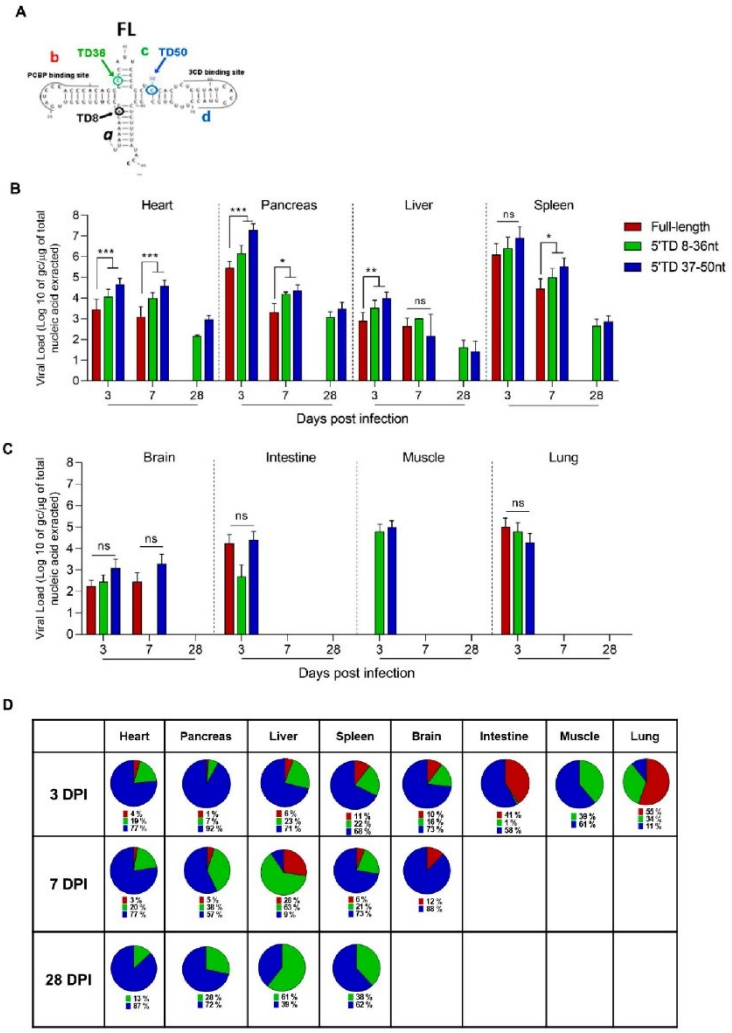


Figure 2. Emergence and maintenance of 5′TD EV-B populations in organs of CVB3/28-infected mice. (**A**) Schematic representation of EV-B cloverleaf secondary structures with stem "a" and stem-loops "b", "c", and "d". Schematic representations of deletions of 8, 36, and 50 nucleotides and its impact on cloverleaf secondary structures, loss of stem "a", stem "a" plus stem-loop "b", and loss of stem "a" and stem-loops "b-c", respectively. (**B**,**C**) EV-B FL and 5′TD respective viral loads were measured using a RACE-PCR method associated with a micro-electrophoresis (Agilent®) in organs of CVB3/28-infected mice (n = 8 to 10 in B; n = 3 to 6 in) (**C**). Data represents mean + SEM (Mann–Whitney U test; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ns: non-significant). (**D**) Schematic representation of full-length and 5′TD populations percentages. Data represents mean. TD: terminally deleted.

3.3. Inflammatory Cytokines Secretion and Cellular Infiltrates during Acute and Chronic CVB3/28 Infection

As CVB3/28 5′TD forms emerged and became major, early after systemic infection in all studied organs, we investigated their impact on the inflammatory profile at acute and chronic stages of infection. In the heart and pancreas, CVB3/28 infection induced a strong inflammatory cytokines production, such as IL-10, TNF-α, and MCP-1 (Figure 3B–D). By contrast, the inflammatory response in the liver was weak with no MCP-1 increase (Figure 3C). Several organs without viral genome RNA persistence exhibited different inflammatory response profiles, including IL-10 levels decrease (for the spleen, intestine, and lung tissues) associated with MCP-1 levels increase and no TNF-α levels increase for all of these (Figure 3B–D). Interestingly, IFN-β levels were not increased in any organ (Figure 3A). IFN-α was not increased either (data not shown). Inflammatory cells (T-lymphocytes CD3 and macrophages CD68) infiltrates were found only in the heart, pancreas, and liver tissues (Figure 3E).

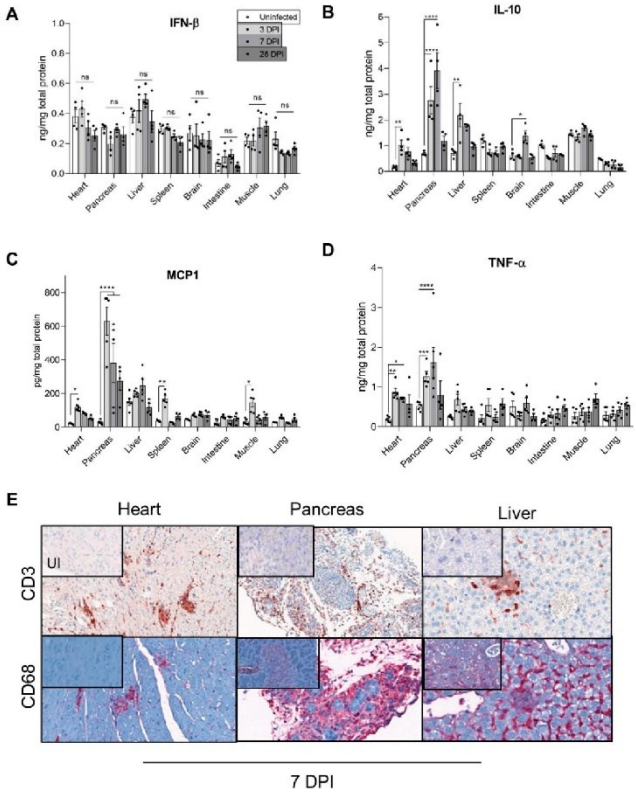


Figure 3. Inflammatory response in organs of CVB3/28-infected DBA/2J mice. (**A**–**D**) IFN-β, IL-10, TNF-α, and MCP1 levels were measured by ELISA in homogenized organs supernatants of CVB3/28-infected DBA/2J mice and compared to cytokines levels in homogenized organs supernatants of uninfected DBA/2J mice (n = 4 to 5). Data represent mean +/− SEM (Mann–Whitney U test; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns or not specified: non-significant). (**E**) Positive CD3 and CD68 cells were found in inflammatory foci or infiltrates at 7 DPI only in the heart, pancreas, and liver. They were absent in other organs and in uninfected mice. Original magnification: heart, 200×; pancreas and liver, 400×. DPI: Days Post Infection. UI: Uninfected.

These results demonstrated that the emergence and maintenance of EV-B 5′TD were associated with a specific inflammatory profile, including IL-10, TNF-α, and MCP-1 local secretion and no IFN-β production (Figure 3). In organs without the maintenance of viral genome RNA forms, such an inflammatory profile was not found. Similarly, inflammatory cell recruitment was only found in organs displaying persistent CVB3 5′TD RNA forms.

3.4. Impact of 5′TD RNA Forms on Histological Lesions and Cellular Specialized Functions in CVB3/28 Infected Tissues

To explore the impact of emerging 5′TD RNA forms on organ pathology, histology analyses were performed to detect acute and chronic lesions at 7 and 28 DPI. Massive inflammation and necrosis were found in the heart, pancreas, and liver at 7 DPI (Figure 4A–C). Fibrosis was present only in cardiac tissues at 28 DPI, whereas adipose tissue replacement was found in the pancreas (Figure 4A–C). Inflammation and necrosis were present in the liver at 7 DPI without scarring after 28 DPI (Figure 4A–C). Brain, spleen, intestines, lungs, and muscle were otherwise normal at 7 and 28 DPI (Figure 4B). CVB3/28-induced acute inflammation and necrosis consistent with an acute phase of infection were found in the heart, pancreas, and liver. Lesions consistent with chronic infection were found only in the heart and pancreas (Figure 4A–C).

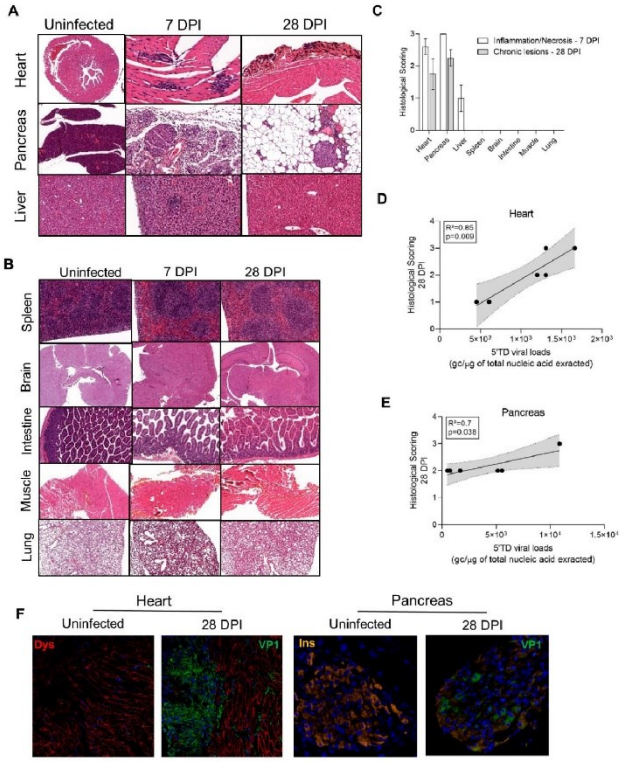


Figure 4. Histological lesions and cell dysfunctions in organs of CVB3/28-infected DBA/2J mice. (**A**) In the infected group, cardiac lesions were found from 7 DPI to 28 DPI. Infected mice exhibited multiple inflammatory foci at 7 DPI. At 14 and 28 DPI, calcified fibrosis was found. At 7 DPI, diffuse pancreatic inflammatory infiltrates with necrosis were found, sparing islets cells. After 14 DPI, an adipose tissue replacement was found, sparing islets cells. Hepatitis was found at 7 DPI, characterized

by sparse inflammatory and necrosis foci or sub capsular inflammatory infiltrates. After 14 DPI, no inflammatory or scarring lesions were found. HES, haematoxylin-eosin-safran staining. Original magnification: 10× to 400×. (**B**) Neither acute nor chronic lesions were found in other organs including the brain, spleen, intestines, lungs, or muscle. Original magnification: 10× to 400×. (**C**) Inflammation and necrosis were found in the heart and pancreas at 7 DPI (n = 3 to 5). Fibrosis was present only in the heart at 28 DPI (n = 4). Inflammation and necrosis were present in the liver at 7 DPI (n = 3) only, with no chronic histological lesion. No lesion was found in other organs (n = 3). Data represent mean +/− SEM. (**D**,**E**) In the heart (n = 6) and pancreas (n = 6) of infected DBA/2J mice, a positive correlation between histological lesion scoring at 28 DPI and the 5′TD EV-B load. Linear regression curve, with 95% confidence intervals in grey. (**F**) Confocal analyses revealed a colocalization of VP1 and dystrophin disruption in the heart, and of VP1 and a decrease in insulin staining in the pancreas, at 28 DPI. DPI: Days Post Infection.

Histological lesion scorings were positively correlated with 5′TD viral loads in the heart and the pancreas at 28 DPI (R^2 = 0.89, p = 0.009 and R^2 = 0.7, p = 0.038, respectively; Figure 4D,E). In the heart, at 28 DPI, VP1 was detected in cardiomyocytes by immunofluorescence staining, with colocalization of VP1 expression and dystrophin disruption (Figure 4F). In Langerhans beta cells of the pancreas, VP1 was detected with a decrease in insulin staining or insulin content (Figure 4F). These results indicated that a CVB3/28 persistent infection in target cells—cardiomyocytes and beta cells—associated with chronic histological lesions induced cellular dysfunctions related to pathological processes such as dystrophin cleavage or insulin metabolism impairment.

4. Discussion

In the present study, we investigated how deletions within the 5′UTR affecting the RNA domain I (cloverleaf) structure are related to natural acute and chronic EV-B infections in an immunocompetent mouse model. We evidenced an early emergence of major EV-B 5′TD populations during the acute phase of infection in all studied organs (Figure 2). Major proportions of 5′TD viral populations associated with minor or undetectable full-length viral forms were maintained during chronic infections in the heart, pancreas, and liver of a CVB3/28-infected DBA/2J mouse (Figure 2B,C). Moreover, we showed that these viral RNA forms were related to a chronic persistent infection with histological lesions in the heart and pancreas only (Figures 1–4).

The 5′ terminal deletions of RNA viruses (foot-and-mouth disease, Seoul virus, etc.) have been reported, sometimes in association with low virulence or a persistent infection [25–27]. RNA-dependent RNA polymerase errors, lack of proofreading, and/or loss of the replication initiation site in 5′UTR are likely to explain the early generation of EV-B 5′TD RNA forms in all study organs (Figure 2B,C) [8,24]. The maintenance of EV-B 5′TD populations was observed only in target organs with histological lesions, whereas proportions of full-length and 5′TD forms were found to be similar and were transiently detected in organs with no lesion (Figure 2B,C). The absence of viral particle detection in the lung, intestines, and brain could be related to specific cell conditions and innate immune response limiting full-length and 5′TD forms replication and translation early during CVB3/28 infection in this model (Figures 1 and 2). These results suggested an evolutionary advantage of 5′TD RNA forms in specific host cell conditions. EV-B 5′TD forms have been shown to be generated only in quiescent (non-dividing) cells in vitro [8]. Differences in cell-type distribution and replication dynamics of EV-B populations could be explained by various expression levels of replication complex cellular factors such as hnRNP C (heterogeneous ribonucleoprotein particle). Their low levels could provide an evolutionary advantage to 5′TD RNA forms over hnRNP C-dependent full-length RNA forms replication, thereby enabling them to become dominant virus populations in target cells: cardiomyocytes, Langerhans beta cells, hepatocytes, or immune cells in the spleen (Figure 2B) [28]. It is well established that the host protein hnRNP C can bind the 5′ termini

of full-length poliovirus negative-strand RNA intermediates promoting the synthesis of positive-strand EV RNA [29,30]. Overall, our results suggest that host proteins of RNP complexes of the negative strand 3′ end, possibly hnRNP C, could provide an early replicative advantage to the 5′TD viral forms in specific cells [9,28,31]. Intracellular restriction factors are powerful barriers against viruses [32]. Restriction factors play an important role in the organization of antiviral cellular immunity, with tissue-dependent expression [32,33]. Authors have reported that A3G (APOBEC3G), AUF1 (AU-rich binding factor 1), a cellular protein involved in mRNA stability, and TRIM7 bind to the 5′UTR of various EV-B to limit either viral protein translation or genome replication [16–18]. Together with our results, 5′TD viral populations could gain a replicative advantage over full-length forms, by the loosening of restriction factors' binding sites in specific organ cell conditions.

During RNA virus infections, the emergence of mutant genomes has been reported and has been defined as viral quasispecies [34]. The 5′TD EV-B genomes fulfilled the criteria of quasispecies, having a lower viral fitness than the complete populations from which it derived [34]. Thus, these 5′TD enteroviral quasispecies became dominant in target cells in our model with sustained viral protein synthesis activities. However, the impact of each 5′TD RNA form on the host cells, or their cooperation or interference with each other, remains to be explored. The sensitivity of the micro-electrophoresis is limited, thus viral populations with a full-length genome could still be present in single target cells, but with such a low level that it is undetectable without high-throughput techniques such as single-cell RNA sequencing or next-generation sequencing [34]. We could not measure the RNA fragmentation burden before the RACE-PCR; however, we used viral synthetic RNA forms as controls (Figure S2).

We identified different inflammatory response profiles in acutely infected organs (Figure 3). The increase in MCP1, TNF-α, and IL-10 levels in the heart and pancreas could be early mediated in a toll-like receptor/TLR3-dependent manner and be responsible for inflammatory cell recruitment and infected-cell-induced apoptosis (Figures 3E and 4A) [35,36]. Sustained IL-10 and MCP1 high levels found in cardiac and pancreatic tissues have been shown to exert an immunosuppressive activity and promote a T helper/Th2 inflammatory response switch resulting in an altered immune modulatory response and potentially promoting a persistent viral infection [37,38]. The inflammatory response in the liver was lower than in the heart or pancreas and was not associated with chronic hepatitis (Figure 3B–D). In the brain, spleen, and muscle, a transient inflammatory response was observed (IL-10 and MCP1), with no histological lesions (Figure 3B–D and Figure 4B). These results suggest that a lower secretion of IL-10 or MCP1 could enhance viral clearance, as previously described by some authors [37,38]. Consistently with these findings, inflammatory cell infiltrates were increased in the heart and pancreas in comparison with the liver (Figure 3E).

Remarkably, no significant IFN-β level increase was evidenced at the acute phase of infection in all target organs (Figure 3A). The innate immune response mediated by type 1 IFN is a key step in the progression of acute viral infection, which may evolve toward either healing or chronic infection [39]. The importance of this system is evidenced by the variety of mechanisms used by RNA (+) viruses to evade or inhibit IFN induction, signaling, or effector functions and by the various deleterious phenotypes found in humans and mice with genetic disruptions in IFN-β production or signaling [40,41]. Interestingly, 5′UTR deletions have been reported in hepatitis C virus, dengue virus, foot-and-mouth disease, or African swine fever virus, either during persistent infection or with a reduced virulence with a weak IFN response [25,27,42,43]. Recently, 5′TD EV-B with the largest deletions (36–50 nt) have been negatively correlated with IFN response in the blood of acutely EV-infected patients [11]. Consistently, IFN beta therapy has been shown to be effective in EV-induced dilated cardiomyopathy in humans [44]. Together, these findings should stimulate clinical research in immunomodulatory therapies in persistent EV-induced infections and related pathologies.

Chronic lesions and VP1 expression were found only in the heart and the pancreas, associated with dystrophin and reduced insulin content, respectively (Figure 4D–F). These

results indicate that 5′TD viral form persistence with viral protein expression impairs cell functions, such as cytoskeletal disarray and reduced insulin content. Dystrophin degradation has been shown to be the consequence of the viral protease 2A activity, even in 5′TD EV-B infection [45]. Insulin production decrease could be linked to viral protease activity on cellular translator factors [46,47]. Such impairment of specialized cell functions has been shown to be directly linked to the development of dilated cardiomyopathy or type 1 diabetes in mice and humans [48–51].

Such results show that 5′TD viral forms are key drivers in cardiac and pancreatic pathogenesis during EV-B infection. Indeed, dystrophin cleavage is a well-known mechanism of EV-B pathogenicity inducing dilated cardiomyopathy, whereas insulin production decrease is the first step of type 1 diabetes development. Consequently, vaccination against EV-B could have a great impact on public health, years after the vaccination, limiting the development of dilated cardiomyopathy or type 1 diabetes, and efforts should be made to develop such vaccines [52].

5. Conclusions

Overall, our results show the natural early emergence of major EV-B 5′TD populations in various organs in mice, and that their maintenance drives the development of a persistent infection of the heart and pancreas associated with specialized cell dysfunctions. Our experimental findings provide important new insights into the role of 5′TD RNA forms as major key pathophysiological factors in EV-B-induced acute and persistent infections of target cells. Further experimental and clinical investigations are needed to confirm our results and to better understand the pathophysiological role of 5′TD populations in EV-B-induced human infections and pathologies. Preventive strategies based on vaccination could limit the development of such persistent infections and chronic pathologies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/vaccines10081203/s1, Figure S1: Mortality and viremia in CVB3/28-infected DBA/2J mice. Figure S2: Detection of 5′end deletions in CVB3/28 genome by PCR and micro-electrophoresis.

Author Contributions: Conceptualization, P.F., L.A. and F.B.; Data curation, D.C.; Formal analysis, D.C.; Funding acquisition, L.A. and F.B.; Investigation, D.C., A.-L.L., N.B., C.F., P.F. and F.B.; Methodology, D.C., A.-L.L., N.B., C.F. and F.B.; Project administration, F.B.; Resources, L.A.; Supervision, P.F., L.A. and F.B.; Validation, F.B.; Visualization, D.C. Writing—original draft, D.C. and F.B.; Writing—review and editing, P.F., L.A. and F.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by "Fédération Française de Cardiologie" (FFC grant 2019) and University of Reims Champagne Ardennes (URCA) research team grant.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the committee of animal experiments of the Reims Champagne-Ardenne (accreditation number 56) and then by the Ministry of Education and Research (permit number #5463-201704171500306).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available under request to the corresponding author.

Acknowledgments: We thank the laboratory animal house department of the Faculty of Pharmacy and Medicine (URCA, Reims, France). We thank Christine Terryn (URCAcyt, URCA, Reims, France) for her precious help in confocal images generation and analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Baggen, J.; Thibaut, H.J.; Strating, J.R.P.M.; van Kuppeveld, F.J.M. The Life Cycle of Non-Polio Enteroviruses and How to Target It. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 368–381. [CrossRef] [PubMed]
2. Genoni, A.; Canducci, F.; Rossi, A.; Broccolo, F.; Chumakov, K.; Bono, G.; Salerno-Uriarte, J.; Salvatoni, A.; Pugliese, A.; Toniolo, A. Revealing Enterovirus Infection in Chronic Human Disorders: An Integrated Diagnostic Approach. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5013. [CrossRef] [PubMed]

3. Tracy, S.; Smithee, S.; Alhazmi, A.; Chapman, N. Coxsackievirus Can Persist in Murine Pancreas by Deletion of 5′ Terminal Genomic Sequences: Coxsackievirus Persistence in the Pancreas. *J. Med. Virol.* **2015**, *87*, 240–247. [CrossRef] [PubMed]
4. Tam, P.E.; Fontana, D.R.; Messner, R.P. Coxsackievirus B1–Induced Chronic Inflammatory Myopathy: Differences in Induction of Autoantibodies to Muscle and Nuclear Antigens by Cloned Myopathic and Amyopathic Viruses. *J. Lab. Clin. Med.* **2003**, *142*, 196–204. [CrossRef]
5. 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* **2008**, *375*, 480–491. [CrossRef]
6. Bouin, A.; Nguyen, Y.; Wehbe, M.; Renois, F.; Fornes, P.; Bani-Sadr, F.; Metz, D.; Andreoletti, L. Major Persistent 5′ Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in Human Endomyocardial Tissues. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1488–1490. [CrossRef]
7. Bouin, A.; Gretteau, P.-A.; Wehbe, M.; Renois, F.; N'Guyen, Y.; Leveque, N.; Vu, M.N.; Tracy, S.; Chapman, N.M.; Bruneval, P.; 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**, *139*, 2326–2338. [CrossRef]
8. Kim, K.-S.; Tracy, S.; Tapprich, W.; Bailey, J.; Lee, C.-K.; Kim, K.; Barry, W.H.; Chapman, N.M. 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.* **2005**, *79*, 7024–7041. [CrossRef]
9. Lévêque, N.; Garcia, M.; Bouin, A.; Nguyen, J.H.C.; Tran, G.P.; Andreoletti, L.; Semler, B.L. Functional Consequences of RNA 5′-Terminal Deletions on Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00423-17. [CrossRef]
10. Klingel, K.; Hohenadl, C.; Canu, A.; Albrecht, M.; Seemann, M.; Mall, G.; Kandolf, R. Ongoing Enterovirus-Induced Myocarditis Is Associated with Persistent Heart Muscle Infection: Quantitative Analysis of Virus Replication, Tissue Damage, and Inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 314–318. [CrossRef]
11. Glenet, M.; N'Guyen, Y.; Mirand, A.; Henquell, C.; Lebreil, A.-L.; Berri, F.; Bani-Sadr, F.; Lina, B.; Schuffenecker, I.; Andreoletti, L. Major 5′terminally Deleted Enterovirus Populations Modulate Type I IFN Response in Acute Myocarditis Patients and in Human Cultured Cardiomyocytes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11947. [CrossRef]
12. Kim, K.-S.; Chapman, N.M.; Tracy, S. Replication of Coxsackievirus B3 in Primary Cell Cultures Generates Novel Viral Genome Deletions. *J. Virol.* **2008**, *82*, 2033–2037. [CrossRef]
13. Glenet, M.; Heng, L.; Callon, D.; Lebreil, A.-L.; Gretteau, P.-A.; Nguyen, Y.; Berri, F.; Andreoletti, L. Structures and Functions of Viral 5′ Non-Coding Genomic RNA Domain-I in Group-B Enterovirus Infections. *Viruses* **2020**, *12*, 919. [CrossRef]
14. Feng, Q.; Langereis, M.A.; Olagnier, D.; Chiang, C.; van de Winkel, R.; van Essen, P.; Zoll, J.; Hiscott, J.; van Kuppeveld, F.J.M. Coxsackievirus Cloverleaf RNA Containing a 5′ Triphosphate Triggers an Antiviral Response via RIG-I Activation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95927. [CrossRef]
15. Feng, Q.; Hato, S.V.; Langereis, M.A.; Zoll, J.; Virgen-Slane, R.; Peisley, A.; Hur, S.; Semler, B.L.; van Rij, R.P.; van Kuppeveld, F.J.M. MDA5 Detects the Double-Stranded RNA Replicative Form in Picornavirus-Infected Cells. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 1187–1196. [CrossRef]
16. Cathcart, A.L.; Rozovics, J.M.; Semler, B.L. Cellular MRNA Decay Protein AUF1 Negatively Regulates Enterovirus and Human Rhinovirus Infections. *J. Virol.* **2013**, *87*, 10423–10434. [CrossRef]
17. Li, Z.; Yang, X.; Zhao, Z.; Liu, X.; Zhang, W. Host Restriction Factor A3G Inhibits the Replication of Enterovirus D68 by Competitively Binding the 5′ Untranslated Region with PCBP1. *J. Virol.* **2022**, *96*, e0170821. [CrossRef]
18. Fan, W.; Mar, K.B.; Sari, L.; Gaszek, I.K.; Cheng, Q.; Evers, B.M.; Shelton, J.M.; Wight-Carter, M.; Siegwart, D.J.; Lin, M.M.; et al. TRIM7 Inhibits Enterovirus Replication and Promotes Emergence of a Viral Variant with Increased Pathogenicity. *Cell* **2021**, *184*, 3410–3425.e17. [CrossRef]
19. Tu, Z.; Chapman, N.M.; Hufnagel, G.; Tracy, S.; Romero, J.R.; Barry, W.H.; Zhao, L.; Currey, K.; Shapiro, B. The Cardiovirulent Phenotype of Coxsackievirus B3 Is Determined at a Single Site in the Genomic 5′ Nontranslated Region. *J. Virol.* **1995**, *69*, 4607–4618. [CrossRef]
20. Basso, C.; Aguilera, B.; Banner, J.; Cohle, S.; d'Amati, G.; de Gouveia, R.H.; di Gioia, C.; Fabre, A.; Gallagher, P.J.; Leone, O.; et al. Guidelines for Autopsy Investigation of Sudden Cardiac Death: 2017 Update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Arch.* **2017**, *471*, 691–705. [CrossRef]
21. Caforio, A.L.P.; Pankuweit, S.; Arbustini, E.; Basso, C.; Gimeno-Blanes, J.; Felix, S.B.; Fu, M.; Helio, T.; Heymans, S.; Jahns, R.; 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.* **2013**, *34*, 2636–2648. [CrossRef]
22. Andréoletti, L.; Hober, D.; Becquart, P.; Belaich, S.; Copin, M.C.; Lambert, V.; Wattré, P. 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.* **1997**, *52*, 206–214. [CrossRef]
23. N'Guyen, Y.; Lesaffre, F.; Metz, D.; Tassan, S.; Saade, Y.; Boulagnon, C.; Fornes, P.; Renois, F.; Andreoletti, L. Enterovirus but Not Parvovirus B19 Is Associated with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy and Endomyocardial CD3, CD68, or HLA-DR Expression. *J. Med. Virol.* **2017**, *89*, 55–63. [CrossRef]

24. Lévêque, N.; Renois, F.; Talmud, D.; Nguyen, Y.; Lesaffre, F.; Boulagnon, C.; Bruneval, P.; Fornes, P.; Andréoletti, L. Quantitative Genomic and Antigenomic Enterovirus RNA Detection in Explanted Heart Tissue Samples from Patients with End-Stage Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 3378–3380. [CrossRef]
25. Escarmís, C.; Dopazo, J.; Dávila, M.; Palma, E.L.; Domingo, E. Large Deletions in the 5′-Untranslated Region of Foot-and-Mouth Disease Virus of Serotype C. *Virus Res.* **1995**, *35*, 155–167. [CrossRef]
26. Meyer, B.J.; Schmaljohn, C. Accumulation of Terminally Deleted RNAs May Play a Role in Seoul Virus Persistence. *J. Virol.* **2000**, *74*, 1321–1331. [CrossRef]
27. Zani, L.; Forth, J.H.; Forth, L.; Nurmoja, I.; Leidenberger, S.; Henke, J.; Carlson, J.; Breidenstein, C.; Viltrop, A.; Höper, D.; et al. Deletion at the 5′-End of Estonian ASFV Strains Associated with an Attenuated Phenotype. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6510. [CrossRef]
28. Kamma, H.; Portman, D.S.; Dreyfuss, G. Cell Type-Specific Expression of HnRNP Proteins. *Exp. Cell Res.* **1995**, *221*, 187–196. [CrossRef]
29. 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.* **2010**, *84*, 4229–4242. [CrossRef]
30. Brunner, J.E.; Nguyen, J.H.C.; Roehl, H.H.; Ho, T.V.; Swiderek, K.M.; Semler, B.L. Functional Interaction of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C with Poliovirus RNA Synthesis Initiation Complexes. *J. Virol.* **2005**, *79*, 3254–3266. [CrossRef]
31. Brunner, J.E.; Ertel, K.J.; Rozovics, J.M.; Semler, B.L. Delayed Kinetics of Poliovirus RNA Synthesis in a Human Cell Line with Reduced Levels of HnRNP C Proteins. *Virology* **2010**, *400*, 240–247. [CrossRef] [PubMed]
32. Vartanian, J.-P.; Henry, M.; Marchio, A.; Suspène, R.; Aynaud, M.-M.; Guétard, D.; Cervantes-Gonzalez, M.; Battiston, C.; Mazzaferro, V.; Pineau, P.; et al. Massive APOBEC3 Editing of Hepatitis B Viral DNA in Cirrhosis. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000928. [CrossRef] [PubMed]
33. Stenglein, M.D.; Burns, M.B.; Li, M.; Lengyel, J.; Harris, R.S. APOBEC3 Proteins Mediate the Clearance of Foreign DNA from Human Cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 222–229. [CrossRef] [PubMed]
34. Domingo, E.; Perales, C. Viral Quasispecies. *PLoS Genet.* **2019**, *15*, e1008271. [CrossRef] [PubMed]
35. Sesti-Costa, R.; Françozo, M.C.S.; Silva, G.K.; Proenca-Modena, J.L.; Silva, J.S. TLR3 Is Required for Survival Following Coxsackievirus B3 Infection by Driving T Lymphocyte Activation and Polarization: The Role of Dendritic Cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0185819. [CrossRef] [PubMed]
36. Gorbea, C.; Makar, K.A.; Pauschinger, M.; Pratt, G.; Bersola, J.L.F.; Varela, J.; David, R.M.; Banks, L.; Huang, C.-H.; Li, H.; et al. A Role for Toll-like Receptor 3 Variants in Host Susceptibility to Enteroviral Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23208–23223. [CrossRef] [PubMed]
37. Ng, C.T.; Oldstone, M.B.A. IL-10: Achieving Balance during Persistent Viral Infection. In *Interleukin-10 in Health and Disease*; Current Topics in Microbiology and Immunology; Fillatreau, S., O'Garra, A., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; Volume 380, pp. 129–144; ISBN 978-3-662-43491-8.
38. Deshmane, S.L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B.E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.* **2009**, *29*, 313–326. [CrossRef] [PubMed]
39. McNab, F.; Mayer-Barber, K.; Sher, A.; Wack, A.; O'Garra, A. Type I Interferons in Infectious Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 87–103. [CrossRef]
40. Weber, F.; Kochs, G.; Haller, O. Inverse Interference: How Viruses Fight the Interferon System. *Viral Immunol.* **2004**, *17*, 498–515. [CrossRef]
41. Dobrikov, M.I.; Dobrikova, E.Y.; McKay, Z.P.; Kastan, J.P.; Brown, M.C.; Gromeier, M. PKR Binds Enterovirus IRESs, Displaces Host Translation Factors, and Impairs Viral Translation to Enable Innate Antiviral Signaling. *mBio* **2022**, *13*, e0085422. [CrossRef]
42. Cheroni, C.; Donnici, L.; Aghemo, A.; Balistreri, F.; Bianco, A.; Zanoni, V.; Pagani, M.; Soffredini, R.; D'Ambrosio, R.; Rumi, M.G.; et al. Hepatitis C Virus Deletion Mutants Are Found in Individuals Chronically Infected with Genotype 1 Hepatitis C Virus in Association with Age, High Viral Load and Liver Inflammatory Activity. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138546. [CrossRef]
43. Cahour, A.; Pletnev, A.; Vazielle-Falcoz, M.; Rosen, L.; Lai, C.J. Growth-Restricted Dengue Virus Mutants Containing Deletions in the 5′ Noncoding Region of the RNA Genome. *Virology* **1995**, *207*, 68–76. [CrossRef]
44. Kühl, U.; Lassner, D.; von Schlippenbach, J.; Poller, W.; Schultheiss, H.-P. Interferon-Beta Improves Survival in Enterovirus-Associated Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2012**, *60*, 1295–1296. [CrossRef]
45. Badorff, C.; Lee, G.-H.; Lamphear, B.J.; Martone, M.E.; Campbell, K.P.; Rhoads, R.E.; Knowlton, K.U. Enteroviral Protease 2A Cleaves Dystrophin: Evidence of Cytoskeletal Disruption in an Acquired Cardiomyopathy. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 320–326. [CrossRef]
46. Baden, M.Y.; Fukui, K.; Hosokawa, Y.; Iwahashi, H.; Imagawa, A.; Shimomura, I. Examination of a Viral Infection Mimetic Model in Human IPS Cell-Derived Insulin-Producing Cells and the Anti-Apoptotic Effect of GLP-1 Analogue. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144606. [CrossRef]
47. Nekoua, M.P.; Bertin, A.; Sane, F.; Gimeno, J.-P.; Fournier, I.; Salzet, M.; Engelmann, I.; Alidjinou, E.K.; Hober, D. Persistence of Coxsackievirus B4 in Pancreatic β Cells Disturbs Insulin Maturation, Pattern of Cellular Proteins, and DNA Methylation. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1125. [CrossRef]
48. Lim, B.-K.; Peter, A.K.; Xiong, D.; Narezkina, A.; Yung, A.; Dalton, N.D.; Hwang, K.-K.; Yajima, T.; Chen, J.; Knowlton, K.U. Inhibition of Coxsackievirus-Associated Dystrophin Cleavage Prevents Cardiomyopathy. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 5146–5151. [CrossRef]

49. Xiong, D.; Lee, G.-H.; Badorff, C.; Dorner, A.; Lee, S.; Wolf, P.; Knowlton, K.U. Dystrophin Deficiency Markedly Increases Enterovirus-Induced Cardiomyopathy: A Genetic Predisposition to Viral Heart Disease. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 872–877. [CrossRef]
50. Alidjinou, E.K.; Sané, F.; Engelmann, I.; Geenen, V.; Hober, D. Enterovirus persistence as a mechanism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Discov. Med.* **2014**, *18*, 273–282.
51. Krogvold, L.; Edwin, B.; Buanes, T.; Frisk, G.; Skog, O.; Anagandula, M.; Korsgren, O.; Undlien, D.; Eike, M.C.; Richardson, S.J.; et al. Detection of a Low-Grade Enteroviral Infection in the Islets of Langerhans of Living Patients Newly Diagnosed With Type 1 Diabetes. *Diabetes* **2015**, *64*, 1682–1687. [CrossRef]
52. Dunne, J.L.; Richardson, S.J.; Atkinson, M.A.; Craig, M.E.; Dahl-Jørgensen, K.; Flodström-Tullberg, M.; Hyöty, H.; Insel, R.A.; Lernmark, A.; Lloyd, R.E.; et al. Rationale for Enteroviral Vaccination and Antiviral Therapies in Human Type 1 Diabetes. *Diabetologia* **2019**, *62*, 744–753. [CrossRef]

Supplementary Materials

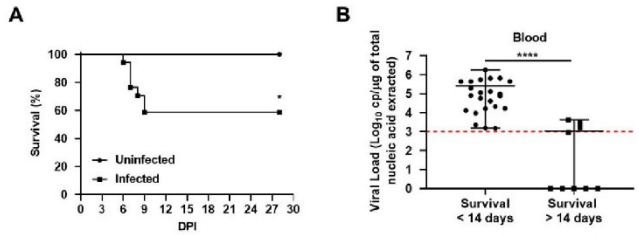


Figure S1. **Mortality and viremia in CVB3/28-infected DBA/2J mice**. (**A**) Survival curve of infected DBA2/J mice (n = 17; black circle) with 10^6 PFU/ml of CBV3/28 compared to uninfected mice (n = 8; black square). Mock-infected mice had a 100% survival at 28 DPI, whereas infected mice had 41% survival (7/17) (*: $p < 0.05$ by Log-Rank test). (**B**) Comparison of viremia between CVB3/28-infected DBA2/J mice with high or low mortality, to assess a viral load significance threshold of 103 gc/nucleic acid extracted in blood (n = 23: 2–7 DPI; n = 9: 28 DPI). Data represent mean +/− range (****: $p < 0.0001$ by Mann-Whitney U test).

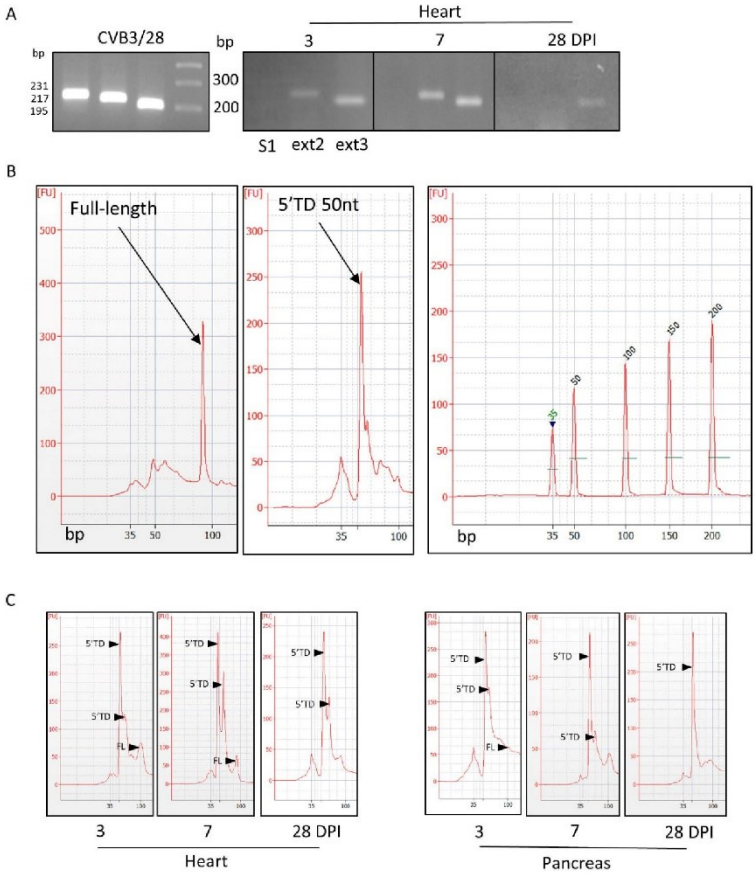


Figure S2. Detection of 5'end deletions in CVB3/28 genome by PCR and micro-electrophoresis. (**A**) PCR was performed with successive priming in the 5'end. S1 binds to full-length forms, ext2 binds to 15 to 34nt of the 5'end, and ext3 binds to 37 to 57nt of the 5'end. Each of the 5' terminus primers amplified cDNA from the wild type CVB3/28 positive control RNA. However, only ext2 and ext3 amplified cDNA from heart samples at 3 and 7 DPI, and only ext3 amplified cDNA from heart samples at 28 DPI. (**B**) Electropherogram following RACE-PCR of synthetic full-length and 5'terminally deleted RNA, and ladder. (**C**) Electropherogram following RACE-PCR of heart and pancreas RNA samples at 3, 7 and 28 DPI. 5'TD : 5'terminally deleted; FL: full-length.

Article 2 : Replication Activities of Major 5'Terminally Deleted Group-B Coxsackievirus RNA Forms Decrease PCSK2 mRNA Expression Impairing Insulin Maturation in Pancreatic Beta Cells

Dans la continuité de notre précédent travail nous avons analysé l'impact des populations d'ARN génomiques d'EV-B tronquées en région 5'NC sur les cellules bêta pancréatiques. Au cours de l'infection pancréatique à CVB3/28 chez la souris DBA/2J, notre travail a consisté à : (i) étudier le métabolisme insulinique chez la souris DBA/2J infectée avec le CVB3/28 ou inoculée avec des populations virales tronquées en région 5'NC pancréatiques ; (ii) étudier l'impact de la transfection des formes virales ARN tronqué en région 5'NC sur le métabolisme insulinique dans un modèle *in vitro* de cellules bêta pancréatiques de rongeur.

Nous avons utilisé un test de stimulation au glucose pour tester la capacité des cellules β pancréatiques à secréter de l'insuline après infection par le CVB3/28 ou transfection d'ARN viraux. Après homogénéisation et centrifugation, nous avons isolé les populations virales tronquées pancréatiques, que nous avons inoculées chez des souris naïves.

Cette expérimentation a montré le tropisme pancréatique des populations virales tronquées en région 5'NC et leur capacité à induire une infection persistante sans virus complet. Dans le pancréas de la souris, l'expression de la protéine VP1 était co-localisée avec une diminution de l'expression d'insuline des cellules pancréatiques. De plus, dans le pancréas de souris infectées, nous avons montré une diminution de l'ARNm de la *pro-hormone serine convertase 2* (PCSK2), associée à une diminution de la concentration plasmatique en insuline. Enfin, la transfection de formes synthétiques d'ARN EVB-TD50 dans des cellules bêta pancréatiques de rongeur diminuait les niveaux d'expression de l'ARNm PCSK2, altérant la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par du glucose.

En conclusion, nos résultats montrent que l'émergence et le maintien des formes réplicatives persistantes d'EV-B tronqué en région 5'NC dans les cellules bêta pancréatiques jouent un rôle important dans la pathogénèse du diabète de type 1.

viruses

MDPI

Article

Replication Activities of Major 5′ Terminally Deleted Group-B Coxsackievirus RNA Forms Decrease PCSK2 mRNA Expression Impairing Insulin Maturation in Pancreatic Beta Cells

Domitille Callon [1,2], Aurélien Guedra [1,2], Anne-Laure Lebreil [1], Laetitia Heng [1], Nicole Bouland [2], Paul Fornès [1,2], Fatma Berri [1,*] and Laurent Andreoletti [1,3,*]

[1] Cardiovir EA-4684, Faculty of Medicine, University of Reims Champagne Ardennes, 51 Rue Cognacq Jay, 51097 Reims, France
[2] Pathology Department, Academic Hospital of Reims, Robert Debré, 51100 Reims, France
[3] Virology Department, Academic Hospital of Reims, Robert Debré, 51100 Reims, France
* Correspondence: fatma.berri@univ-reims.fr (F.B.); landreoletti@chu-reims.fr (L.A.)

Abstract: Emergence of 5′ terminally deleted coxsackievirus-B RNA forms (CVB-TD) have been associated with the development of human diseases. These CVB-TD RNA forms have been detected in mouse pancreas during acute or persistent experimental infections. To date, the impact of the replication activities of CVB-TD RNA forms on insulin metabolism remains unexplored. Using an immunocompetent mouse model of CVB3/28 infection, acute and persistent infections of major CVB-TD populations were evidenced in the pancreas. The inoculation of mice with homogenized pancreases containing major CVB-TD populations induced acute and chronic pancreatic infections with pancreatitis. In the mouse pancreas, viral capsid protein 1 (VP1) expression colocalized with a decrease in beta cells insulin content. Moreover, in infected mouse pancreases, we showed a decrease in pro-hormone convertase 2 (PCSK2) mRNA, associated with a decrease in insulin plasmatic concentration. Finally, transfection of synthetic CVB-TD50 RNA forms into cultured rodent pancreatic beta cells demonstrated that viral replication with protein synthesis activities decreased the PCSK2 mRNA expression levels, impairing insulin secretion. In conclusion, our results show that the emergence and maintenance of major CVB-TD RNA replicative forms in pancreatic beta cells can play a direct, key role in the pathophysiological mechanisms leading to the development of type 1 diabetes.

Keywords: group-B coxsackievirus; pancreatitis; type 1 diabetes; 5′ terminal deletion; insulin

check for updates

Citation: Callon, D.; Guedra, A.; Lebreil, A.-L.; Heng, L.; Bouland, N.; Fornès, P.; Berri, F.; Andreoletti, L. Replication Activities of Major 5′ Terminally Deleted Group-B Coxsackievirus RNA Forms Decrease PCSK2 mRNA Expression Impairing Insulin Maturation in Pancreatic Beta Cells. *Viruses* **2022**, *14*, 2781. https://doi.org/10.3390/v14122781

Academic Editor: Szu-Hao Kung

Received: 10 October 2022
Accepted: 12 December 2022
Published: 13 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is a chronic autoimmune disease characterized by reduced insulin production and caused by a specific immune-mediated loss of insulin-producing beta cells [1]. Etiologically, the initiation and progression of T1D occurs as a consequence of a complex interplay between genetic, immunological and environmental factors [1]. Coxsackie-B viruses (CVBs), which belong to group-B enteroviruses, are the most commonly identified viruses in epidemiological, clinical and histopathological studies of T1D [2–4]. CVBs display a tropism for beta cells, and the expression of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR, CXADR), one of the key entry receptors for the CVB strains, has been demonstrated in beta cells [5,6]. Moreover, both enteroviral RNA and the viral protein 1 (VP1), have been detected at low levels in the pancreases of people with T1D at a higher frequency than in control subjects [2,7].

CVBs are ubiquitous human pathogens transmitted through fecal–oral or respiratory routes. CVBs are non-enveloped viruses, with a single-stranded positive-sense RNA genome of approximately 7,400 nucleotides, flanked on the 5′ end by a highly conserved untranslated region (5′ UTR), crucial for the initiation of the viral replication and translation

activities. CVB's 5′ end is known to contain various immunogenic sequences or secondary structures [8].

CVBs with 5′ end deletions (CVB-TD) have been detected in the murine pancreas during chronic infection without any detectable cytopathic effect [4,9]. These CVB-TD populations are known to maintain low-grade infection in murine pancreases and in human or mouse hearts [9,10]. We recently showed that CVB-TD maintenance in the pancreases of mice is associated with a decrease in insulin content [11]. These findings suggest that CVB-TD is associated with the development of acute and chronic pancreatitis or T1D in mouse models. Moreover, these reports suggest that these CVB-TD forms could be generated early and selected during natural infection. The emergence of these low-level replicating viruses can explain how the CVB genome and VP1 are detectable in beta cells of individuals with both recent-onset and longer-duration T1D.

Many mechanisms of viral pathogenesis of T1D have been suggested [12]. One hypothesis is the stimulation of autoimmunity during CVB infection, with the destruction of pancreatic β-cells [13]. Autoantibodies against islets have been detected during CVB infections [14]. This observation could be explained by a molecular mimicry between the amino acid sequences of the CVB viral protease 2C and Glutamic Acid Decarboxylase 65 (GAD65) [15]. Other autoantigens have been reported in patients with T1D, such as against tyrosine phosphatase IA-2 or proinsulin [13,14,16]. Infection of pancreatic β-cells with CVB can result in the diffusion of cellular epitopes, which may stimulate nearby autoreactive cells. Persistent viral replication and a low-grade local inflammatory response could also be involved in the recruitment of autoreactive cytotoxic T cells to the pancreatic islets [17,18]. In T1D patients, only a small number of autoreactive cells have been detected around or in the islets; thus, the cellular inflammatory response alone might be insufficient to cause T1D [16].

An increase in pro-insulinemia in patients with T1D has also been reported, and can play a role in the onset of pancreatic autoimmunity and T1D [19]. In vitro, pro-hormone convertase 2 (PC2) mRNA expression (PCSK2 gene), an enzyme responsible for the processing of proinsulin to insulin, has been shown to be downregulated after persistent CVB4 infection [20]. Thus, a decrease in PCSK2 expression could impair the maturation of proinsulin and lead to low insulinemia, and an increase in pro-insulinemia, followed by pancreatic autoimmunity. A decrease in PCSK2 expression could be the consequence of the viral protease activity, notably the cleavage of transcription factors by protease 3C [21,22].

To date, it remains unknown whether CVB-TD RNA forms are involved in the acute and chronic infection of beta cells or its impact on insulin maturation. In the present study, we investigated the dynamics of natural emergence of CVB-TD RNA populations in the pancreas, as well as pancreatic pathology development during CVB3/28-induced pancreatitis in DBA/2J mice. To delineate the viral mechanisms of insulin impairment, we investigated the direct effect of CVB-TD50 RNA forms, using transfection of synthetic viral RNA, on insulin secretion and maturation in rodent beta cells. Using in vivo and in vitro experiments, we investigated the link between CVB-TD50 emergence, viral replication and translation activities and insulin metabolism impairment in rodent beta pancreatic cells.

2. Materials and Methods

2.1. Cells, Virus Strain and Reagents

HeLa cells were grown in minimum essential media (MEM), supplemented by 5 mL penicillin–streptomycin (PS) (Gibco®, Paris, France), 5 mL L-Glutamine and 500 mL 10% Fetal Bovine serum (FBS) (ThermoFisher®, Illkirch-Graffenstaden, France). INS-1-E1 (INS-1) cells were a kind gift from Dr. Bertrand Blondeau and Dr. Ghislaine Guillemain (Sorbonne Université, INSERM UMRS938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris) and grown in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI1640) supplemented by 1% PS, 10% FBS, 1 μM Pyruvate (1 M) and 50 μM β-mercapto-ethanol. The integrity of INS-1-E1 cells (insulin production ability) was validated. Cells were initially negative for mycoplasma, then their status was regularly verified by a mycoplasma test (PlasmoTest™, InvivoGen, Toulouse,

France). The CVB3/28 virus strain was a gift from Dr. Steve Tracy (University of Nebraska, Lincoln, NE, USA).

2.2. Virus Production and Titration

HeLa229 cells were seeded at 0.8×10^6 cells per well of tissue culture platelet (6 wells) and then incubated at 37 °C overnight. The next day, cell confluence was evaluated at 1.5×10^6 cells per well. Based on previous experience, cells were then infected with CVB3/28 at a multiplicity of infection (MOI) of 10^{-3} in free-serum MEM. At 48 h post-infection, the supernatant was collected and then clarified using low-speed centrifugation, and virus particles were then measured by plaque-forming-unit assay (PFU). Briefly, HeLa229 cells were infected with CVB3/28, creating serial dilutions, for 1 h at 37 °C. After viral adsorption, the inoculum was harvested, and cells were overlaid with medium containing 2% agarose and incubated at 37 °C. After 3 days, viral plaques were visualized using bromophenol blue staining. The viral titers were expressed as plaque-forming unit per 1 mL (PFU/mL). The deleted 5′ UTR viral sequences were obtained using a two-step PCR approach to delete the 5′ nucleotides and add a hammerhead ribozyme upstream of the viral sequence. The 5′ TD viral RNA were synthesized using a MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen®, Waltham, MA, USA) and purified using a MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit (Invitrogen®).

2.3. Ethic Statement

Experiments were performed according to recommendations of the "National Commission of Animal Experiment (CNEA)" and the "National Committee on the Ethical Reflection of Animal Experiments (CNREEA)". The protocol was approved by the committee of animal experiments of the Reims Champagne-Ardenne (accreditation number 56) and then by Ministry of Advanced Education and research (permits number #5463-201704171500306). All efforts were made to minimize suffering in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Direction des Services Vétérinaires, the French regulations to which our animal care and protocol adhered. Notably, mice were weighed every day and we used a mouse grimace scale to assess suffering.

2.4. Infection of Mice

Male DBA/2J mice, purchased from Charles River laboratory® and housed under pathogen-free conditions, were acclimated for one week before the experimentations (only handling). Two to five mice were housed in one cage, with free access to food and water. Mice were randomly assigned to either infected or non-infected groups. Then, mice (5 weeks old) were inoculated intraperitoneally with 10^6 PFU/mice (CVB3/28) or clarified homogenized-pancreas; uninfected mice were inoculated with 150 µL of saline. To determine survival rates upon infection, loss of body weight was monitored daily for 28 days post-infection, and mice were euthanized if they had $\geq$20% loss of their initial body weight, according to our protocol. Then mice were anesthetized with ketamine/xylazin (42.5/5 mg/kg) and euthanized by cervical dislocation before organ collection at various pre-fixed times points post-infection (8, 16, 24, 48 and 72 h post infection; 7, 14 and 28 days post-infection). Infected or uninfected mice were sacrificed at the indicated times, complete autopsies were performed, and pancreases were taken and either fixed in formaldehyde 4% for histology or homogenized in 600 µL of PBS solution with TissueLyser LT (QIAGEN®, Courtaboeuf, France).

2.5. Histology, Immunohistochemistry and Immunofluorescence

For each sample, four-µm-thick paraffin sections were cut at 3 levels. The slides were stained with hematoxylin, eosin and safran (HES, Pathology department, Academic Hospital of Reims, France). The slides were examined by a pathologist for cellular infiltration and necrosis, blinded to the group assigned (0: no inflammation, no necrosis; 1: sparse inflammatory cells, no necrosis; 2: inflammatory cells infiltrates with necrosis; 3: complete

inflammatory necrosis of the pancreas). In addition, immunostaining (immunohistochemistry) was performed for CD3 (1/1000; Dako, Santa Clara, CA, USA, A0452), CD68 (1/100; Dako, M0814) and VP1 (1/1000; Dako, 5D8/1) as previously described [23,24]. For VP1 immunohistochemistry, a NovoLink Polymer Detection Systems kit (Leica Biosystems, Newcastle, UK) was used, with endogenous peroxidase activity blocking and mouse antigen blocking. For immunofluorescence assays, after using a blocking reagent for mouse antigenicity, 1:200-diluted rabbit anti-insulin (ABclonal, Woburn, MA, USA, A2090), and 1:500-diluted mouse anti-VP1 (Dako, 5D8/1) were used for the staining of cells and fixed pancreas sections. Secondary antibodies were conjugated with AlexaFluor514 (anti-rabbit, 1/200) and AlexaFluor633 (anti-mouse, 1/400) (Thermofischer, Waltham, MA, USA). DAPI (1/10,000; Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to stain cell nuclei. For further analyses, positive islets for VP1 and insulin were selected using QuPath software. Confocal images were acquired by using a Zeiss confocal microscope. Intensities and colocalization (Pearson correlation) were quantified by using QuPath 0.2.3 software (University of Edinburgh, Edinburgh , UK) and JACoP plugin of ImageJ.

2.6. Protein and Viral Titer Quantification

Pancreases of euthanized mice were homogenized in 600 µL of PBS solution with Tissue-Lyser LT (QIAGEN®, Hilden, Germany), and then centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. Blood was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C to obtain plasma. The supernatant or the plasma were used for: (1) measurement of proteins by enzyme-linked immunosorbent assay, such as insulin, proinsulin (Elabscience®, Houston, TX, USA) and GAD/IA2 autoantibodies (MyBiosource®, San Diego, CA, USA); (2) determination of virus particles. Briefly, HeLa229 cells were infected with homogenized pancreas, with serial dilutions, for 1 h at 37 °C. After viral adsorption, the inocula were harvested, and cells were overlaid with medium containing 2% agarose, then incubated at 37 °C. After 3 days, viral plaques were visualized using bromophenol blue staining. Viral titers were expressed as plaque-forming unit per 1 mg of total protein (PFU/mg). The measurement of total protein concentration in each supernatant was performed by the Bicinchoninate Acid Method (Sigma Aldrich®, Saint-Quentin-Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions.

2.7. In Vitro Infection and Transfection

INS-1 were seeded at 2×10^5 cells per well of tissue culture platelet (24 wells) and then incubated at 37 °C overnight. The next day, cells were infected for 1 h at 37 °C with CVB3/28 at the indicated MOI (1 or 10), in free-serum RPMI1640. After viral adsorption, the inocula were harvested and cells were washed with RPMI1640 three times, before an incubation with free-serum RPMI1640 at 37 °C. Cells and supernatants were collected at the indicated times. 2.0×10^5 INS-1 cells per well were seeded in 24-well plates (Nunclon delta surface, Thermo Scientific). The plates were incubated overnight at 37 °C. The transfection mixtures (0.1 mL) consisted of 1 µg of synthetic RNA (full-length or TD50-CVB3 RNA) and 1 µL of Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific) in Opti-MEM Glutamax. The mixtures were incubated for 20 min at room temperature. Cells were washed with DPBS (Thermo Scientific). Then, 100 µL of the mixture was added to the cells, and plates were incubated at 37 °C for 2 h. Cells were then washed three times, and free-serum RPMI1640 was added for incubation at 34 °C. Media were collected at the indicated times for viral load measurements, and cells were used for a glucose-stimulated insulin secretion assay after 24 h of incubation.

2.8. Glucose-Stimulated Insulin Secretion

For insulin secretion measurements, INS-1 cells were starved for 1 h in Krebs Ringer Buffer (KRB, Alfa Aesar®, Haverhill, MA, USA) containing 2 mM glucose (Alfa Aesar). After starvation, medium was exchanged for KRB containing 25 mM glucose in order to measure glucose-stimulated insulin secretion for a 1-h incubation period. The amount of

secreted insulin was measured in the media (ELISA, Elabscience®, Houston, TX, USA), and INS-1 cells were subsequently dissolved in RIPA buffer to measure total protein content. Secreted insulin was normalized to total protein content (ng/mg of total protein).

2.9. Western Blot

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on 4–15% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free gels (BioRad; #4568085) or NuPAGE 3–8% Tris-Acetate gels (Invitrogen, #EA03752BOX), then transferred to cellulose membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) with Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell. The following antibodies were used: anti-VP1 (1/500, Dako, 5D8/1), anti-eIF4G (1/1000, #2469S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and monoclonal anti-β-actin antibody (1/1000, #3700, Cell Signaling Technology). HRP-coupled anti-mouse (1/5000, NA9310V, GE Healthcare) and anti-rabbit (1/10,000, #7074S, Cell Signaling Technology) were used as secondary antibody. Peroxidase activity was visualized with an ECL Plus Western Blotting Detection System (#RPN2132, GE Healthcare).

2.10. Total RNA Isolation and qRT-PCR

The homogenized pancreases were subjected to digestion with proteinase K (Merck®, MO, USA). The total RNA was isolated with the TRIzol RNA Isolation Reagents® (Thermo Fisher®) method according to the manufacturer's instructions. RNA were stored at −80 °C. The viral RNA copy number was quantified by RT–quantitative PCR with a StepOne plus realtime PCR system (ThermoFisher Scientific®) as described previously [11], using primers amplifying the CVB3/28: sense (5′-CAC ACT CCG ATC AAC AGT CA-3′), antisense (5′-GAA CGC TTT CTC CTT CAA CC-3′) and probe FAM/TAMRA (5′-CGT GGC ACA CCA GCC ATG TTT-3′) (Eurogentec®, Seraing, Belgium).

2.11. Reverse Transcription-Quantitative PCR Using SybrGreen® (RT-qPCR)

RNA was extracted from pancreas lysates with TRIzol Reagent® (Invitrogen, Life Technologies) and reverse-transcribed using SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen, Life Technologies, Saint-Aubin, France), following the manufacturer's instructions. cDNA was subjected to PCR using PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific®). The primers used for PCR detection were as follows: for mouse insulin, forward primer: 5′-CGTGGCTTCTTCTACACACCCA-3′, reverse primer: 5′-TGCAGCACTGATCCACAATGCC-3′; for mouse PCSK2, forward primer: 5′-ACCTCTTTGGCTACGGAGTCCT-3′, reverse primer: 5′-TTGAGGGTCAGTACCAGCTTCC-3′; and for mouse ISG15, forward primer: 5′-CATCCTGGTGAGGAACGAAAGG-3′, reverse primer: 5′- CTCAGCCAGAACTGGTCTT CGT-3′. Primers specific to mouse GAPDH (forward primer: 5′-CATCACTGCCACCCAGA AGACTG-3′, reverse primer 5′-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3′) were used as the internal control. PCR was carried out in StepOnePlus Real-Time PCR Systems (ThermoFisher Scientific®), which were programmed as follows: denaturation step at 95 °C for 15 s, annealing/extension step at 65 °C for 1 min (40 cycles) before melting curve. Results were analyzed with the ΔΔCT method, where CT is threshold cycle, and normalized to GAPDH mRNA. Data are represented as levels of mRNA relative to those of the mock transfected control samples, and are displayed as the means ± SD of results from at least three independent in vitro experiments.

2.12. Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR (RACE-PCR)

Viral RNA (200 ng) was reverse transcribed using a Superscript II kit (Invitrogen, ThermoFisher®) with 400 nM AvCRev. The 5′ extremity of cDNA was then ligated with a T4 DNA Ligase (Ambion, ThermoFisher®) and incubated for 24 h at 16 °C. Positive cDNA was amplified by a classical PCR reaction and amplicons were then sized and quantified by Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analyses (Agilent®, Santa Clara, CA, USA) as previously described [11,25]. Due to the sensitivity of the analyzer, results with deletions under 8 nucleotides were waived, and the sequences were classified as full-length.

2.13. Positive and Negative-Strand RNA Ratio

Negative-strand RNA was isolated from total RNA by annealing a biotinylated negative-strand-specific primer and binding to streptavidin-labeled magnetic beads (Invitrogen®, Life Technologies, Saint-Aubin, France), and was then quantified by RT-qPCR as previously described [26]. The positive- to negative-strand viral RNA ratio was then determined using the following calculation: (total EV RNA—negative strand EV RNA)/negative strand EV RNA.

2.14. Single and Double-Strand RNA Ratio

Double-strand EV-B RNA was isolated by digesting single-strand RNA with recombinant bacterial RNase A (ThermoScientific®). A mix of 200 ng of total RNA, 1 µL of RNase and buffer solution of NaCl at 0.3 M was incubated for 10 min at 25 °C. The double-strand viral RNA copy number was quantified with a one-step real-time RT-PCR assay using serial dilutions of the transcripts for the generation of the standard curves. The single-strand to double-strand viral RNA ratio was then determined using the following calculation: (total EV RNA—double-strand EV RNA)/double-strand EV RNA.

2.15. Replication Capacities, Progeny and Encapsidation Assessment

HeLa cells were seeded at 1.5×10^5 cells per well of tissue culture platelet (24 wells) and then incubated at 37 °C overnight. The next day, cell confluence was evaluated, based on previous experience, and cells were infected with 300 µL of homogenized pancreas supernatants for 1 h at 37 °C. Encapsidation of these viral RNA forms was assessed by challenging viral entry capacity with or without proteinase K treatment (Merck®), which digests all proteins, including viral proteins in the sample. After viral adsorption, the inocula were collected, and cells were overlaid with free-serum MEM and incubated at 37 °C. For entry capacity assessment, cells were harvested after the viral adsorption. The viral RNA copy number was quantified by RT–quantitative PCR with a StepOne plus realtime PCR system (ThermoFisher Scientific®) as previously described [11], using primers amplifying the CVB3/28: sense (5′-CAC ACT CCG ATC AAC AGT CA-3′), antisense (5′-GAA CGC TTT CTC CTT CAA CC-3′) and probe FAM/TAMRA (5′-CGT GGC ACA CCA GCC ATG TTT-3′) (Eurogentec®, Seraing, Belgium). With proteinase K treatment, no viral RNA was detected in HeLa cells. We calculated the percentages of viral entry as follow: % = (viral load in HeLa cell after 1 h incubation/viral load in the inoculum).

For replication activity, the supernatant and cells were harvested separately after 72 h. The viral RNA copy number was quantified by RT–quantitative PCR with a StepOne plus realtime PCR system (ThermoFisher Scientific®) as previously described [11], using the same primers. For viral titer measurement, HeLa 229 cells were infected with CVB3/28, creating serial dilutions, for 1 h at 37 °C. After viral adsorption, the inocula were harvested, and cells were overlaid with a medium containing 2% agarose, then incubated at 37 °C. After 3 days, viral plaques were visualized using bromophenol blue staining. The viral titers were expressed as plaque-forming unit per 1 mL (PFU/mL).

2.16. Statistical Analysis

Mann–Whitney's test was used for viral organ data, in vitro viral data and ELISA results. Spearman's correlation test was performed. The observed differences were considered significant at a p value < 0.05. The number (n) of animals used in the experiment is specified in the figure legend. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 (Prism®, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Early Emergence and Maintenance of 5′ Terminally Deleted RNA Forms during CVB3/28-Induced Pancreatitis Are Associated with a Decrease in Viral Replication Levels

To investigate early dynamics of the 5′ terminally deleted (CVB-TD) viral population's emergence in the mouse pancreas, we first quantified the total CVB load in the pancreas

from 8 h to 28 days post infection (H or DPI) (Figure 1A). Pancreatic viral loads exhibited an increase until 48 HPI (Figure 1A). Total pancreatic viral loads exhibited a decrease until 28 DPI, but remained detectable with values under or near a threshold of 10^3 genome copies (gc) per microgram of extracted RNA, as previously described (Figure 1A) [11]. Viral progeny was measured by classical PFU assay, demonstrating a peak at 72 HPI, with an absence of detectable infectious particles at 28 DPI (Figure 1B). To determine the dynamics of emergence of CVB-TD populations, we used a previously validated RACE-PCR to quantify CVB-TD and full-length (CVB-FL) viral populations. Two subpopulations of CVB-TD forms were characterized: one deleted from 8 to 36 nucleotides (nt) and one deleted from 37 to 50 nt (Figure 1C,D). As depicted in Figure 1C,D, CVB-TD forms emerged as early as 8 HPI (Figure 1C,D). These CVB-TD populations were initially associated with CVB-FL forms, which became undetectable after 28 DPI (Figure 1D). We showed that there were significantly more CVB-TD than CVB-FL forms at 3 DPI. The viral load peak during acute pancreatitis ($p < 0.0001$) and that the CVB-TD/FL ratio increased significantly between 3 and 7 DPI ($p < 0.0001$) (Figure 1C–E). Our results evidenced early emergence of CVB-TD populations during acute pancreatitis, without any detectable CVB-FL RNA forms after 28 DPI.

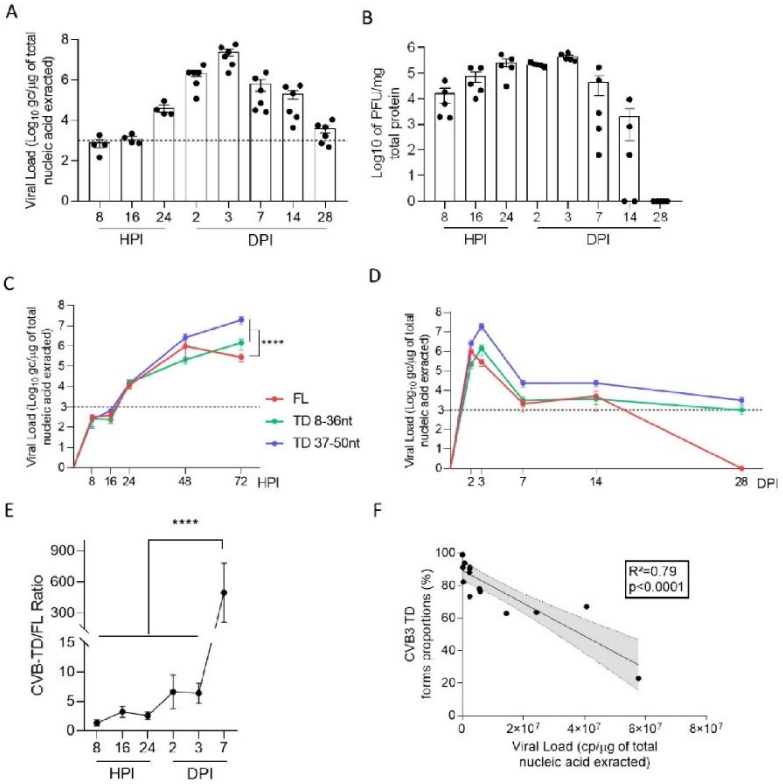


Figure 1. Dynamics of emergence and replication activities of 5′ terminally deleted CVB RNA forms in the pancreas. (**A**) Viral loads were quantified in the pancreas of CVB3/28-infected DBA/2J mice by classic RT-qPCR assay (n = 4 to 6, each dot represents one mouse). The dotted line represents the significance threshold of 10^3 genome copy (gc)/microgram of total nucleic acid extracted. (**B**) Viral

titers were measured in the pancreases of CVB3/28-infected DBA/2J mice by classic plaque-forming unit assay (PFU) (n = 5, each dot represents one mouse). (**C**,**D**) The respective viral loads of EV-B full-length (FL) and 5′TD were measured using a RACE-PCR method associated with micro-electrophoresis (Agilent®) in the pancreases of CVB3/28-infected mice (n = 4 to 8). (**A**–**D**) Data represent mean +/− standard error of the mean (SEM). (**E**) 5′ TD/FL ratio in the pancreases of CVB3/28 infected mice from 8 HPI to 7 DPI. Multiple comparison test of the 5′ TD/FL ratio. ****: $p < 0.0001$, multiple comparisons test. (**F**) Linear regression curves and Spearman R coefficients of correlation between viral loads and 5′ TD EV-B proportions (2 to 7 DPI; n = 15, each dot represents one mouse). DPI: days post infection. HPI: hours post infection. CVB: coxsackievirus. TD: 5′ terminally deleted. FL: full-length. nt: nucleotides.

To explore the potential association between viral genomic replication and CVB-TD populations in vivo, we used correlation analyses. Interestingly, we showed a negative correlation between the proportions of CVB-TD forms and total viral loads (R^2 = 0.79, $p < 0.0001$) between 2 and 7 DPI (Figure 1F). These results showed that, in vivo, CVB-TD emergence results in a decrease in replication activities in pancreatic cells.

3.2. Viral Characteristics of CVB-TD RNA Forms Detected in Pancreases of DBA/2J Mouse

To further evaluate the RNA genomic replication capacities of CVB populations in the mouse pancreas, we determined the (+)/(−) viral RNA and the single/double-strand (ss/ds) viral RNA ratio (Table 1). High (+)/(−) and ss/ds RNA ratios were evidenced at 3 DPI, indicating high levels of viral genomic replication (Table 1). By contrast, after 14 DPI, a decrease in (+)/(−) and ss/ds RNA ratio indicated impaired viral genomic replication (Table 1). Moreover, viral progeny was high at 3 DPI, low at 14 DPI and undetectable at 28 DPI (Figure 2B). We showed that CVB populations at 3 DPI were encapsidated (73%) (+) ssRNA forms, whereas at 14 and 28 DPI, CVB populations were non-encapsidated (9.2% and 2%, respectively) (−) or dsRNA forms (Table 1). Overall, we evidenced high levels of viral genomic replication with production of native infectious viruses in the pancreas before 7 DPI (Figure 1A,B and Table 1). After 28 DPI, we showed that low viral genomic replicative and protein synthesis activity levels, which are hallmarks of viral persistence, were associated with an absence of a detectable viral progeny in the pancreas (Figure 1A,B, and Table 1).

Table 1. Viral properties of CVB-RNA populations in the pancreas.

		Pancreas		
	Days Post Infection	3	14	28
	(+)/(−) vRNA Ratio	44.9	9.2	2.0
	ss/ds vRNA Ratio	48.2	8.4	2.9
Viral cell-culture challenge (HeLa 229 cells, 72-h)	Entry Capacity (%)	73	13	31
	Proteinase K-treated Entry Capacity (%)	0	0	0
	Fold of normalized genome copy increase	207	4.5	9.3
	PFU (PFU/mL)	9×10^6	ND	ND

N = 3; (+)/(−) or ss/ds vRNA ratio: positive/negative or single/double-strand viral RNA ratio. PFU: plaque-forming unit assay; ND: non-detectable.

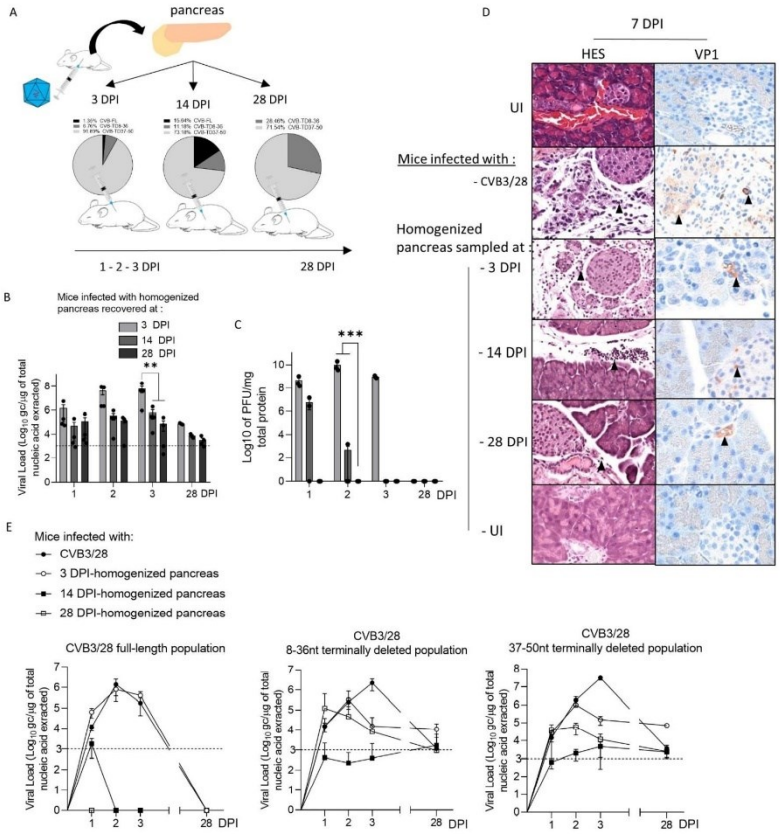


Figure 2. Inoculation of CVB RNA pancreatic populations in DBA/2J mice induced acute and persistent infections with capsid viral protein 1 expression. (**A**) Schematic representation of the experimental procedure. Pancreases were sampled after 3, 14 or 28 days of CVB3/28 infection, and were then homogenized and clarified. Supernatants were inoculated by the intra-peritoneal route to uninfected mice. (**B**) CVB3/28 RNA loads, extracted from pancreases of mice inoculated with 3, 14 or 28 DPI-infected pancreases, were quantified by RT-qPCR (n = 4, each dot represents one mouse). (**C**) Infectious CVB3/28 pancreas virus titers at the indicated time points post-infection of mice inoculated with 3, 14 or 28 DPI-infected pancreases (n = 4, each dot represents one mouse). (**D**) Histological analysis of pancreases from infected or uninfected mice (7 days post-infection). Thin sections of pancreas obtained from uninfected mice or mice inoculated with homogenized pancreas, sampled at 3, 14 or 28 DPI by CVB3/28. Uninfected (UI) pancreases (original magnification: ×200) were stained with hematoxylin, eosin and safran (HES) to evaluate inflammatory infiltrates (arrows). Immunohistochemistry was conducted using a monoclonal antibody for CVB3/28 viral protein 1 (VP1, orange-brown staining, arrows) of mouse pancreas at 7 DPI (original magnification: ×200). The results shown are representative of 3 mice for each group. (**E**) FL, 8–36 nt and 37–50 nt CVB-TD respective viral loads in mouse pancreases were inoculated with homogenized pancreas from 3, 14 and 28 DPI, or CVB3/28-infected and assessed using a RACE-PCR method associated with micro-electrophoresis from 1 to 28 DPI (n = 4 to 8). Data represent mean +/− SEM. Two-way ANOVA test: ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. CVB-FL/TD: full-length or 5′ terminally deleted coxsackievirus. UI: uninfected. DPI: days post-infection.

3.3. CVB-TD Populations from Homogenized Infected Pancreases Induce an Acute and Persistent Infections in Islet Beta Cells with Viral Capsid Protein 1 Expression and Inflammatory Cell Infiltrates

To assess the ability of CVB-TD populations to infect beta cells in vivo, we inoculated DBA/2J mice with clarified, homogenized pancreas, sampled at 3 (1.35% of CVB-FL; 6.76% of CVB-TD 8–36 nt and 91.89% of CVB-TD 37–50 nt), 14 (15.64% of CVB-FL; 11.18% of CVB-TD 8–36 nt and 73.18% of CVB-TD 37–50 nt) or 28 DPI (28.46% of CVB-TD 8–36 nt and 71.54% of CVB-TD 37–50 nt) from CVB3-infected mice (Figure 2A). Following an infection running from 1 to 28 days, we showed that pancreatic CVB-TD populations of infected mice at 3, 14 and 28 DPI had reached the pancreas and demonstrated stable replication activities, without detectable infectious particles at 28 DPI (Figure 2B,C). As expected, CVB populations from 3-DPI homogenized pancreas demonstrated higher replication activities than those from 14 and 28 DPI samples at the acute phase, with no significant variations thereafter ($p < 0.0045$; Figure 2B). Despite the absence of infectious particles in 28-DPI homogenized pancreas supernatants, their intra-peritoneal inoculation induced sparse inflammatory foci or necrosis surrounding Langerhans islets, with VP1 expression in islet cells (Figure 2D). CVB-TD RNA populations remained detectable until 28 DPI in all pancreases, even after 28-DPI homogenized pancreas inoculation, without CVB-FL RNA forms (Figure 2E).

Together, these results show that pancreatic CVB-TD RNA populations from previously CVB3/28-infected pancreases can infect and replicate in pancreases in vivo, with viral protein expression until 28 days post infection, despite the absence of CVB-FL forms or detectable infectious particles.

3.4. Viral Replication and Translation Activities of CVB3/28 RNA Populations Impair the Insulin Content and Maturation in Islet Cells of Immunocompetent Mice

To investigate the impact of CVB3/28 infection on endocrine pancreases, we performed confocal analyses allowing us to explore beta cells' insulin expression. The immunostaining of mouse pancreas sections showed a co-expression of insulin and VP1 proteins in islet cells, increasing between 3 and 28 DPI, as shown on fluorograms (Figure 3A). The insulin/VP1 intensity ratio was elevated until 7 DPI, and decreased at 28 DPI ($p < 0.021$; Figure 3B). The Pearson correlation coefficient increased at 7 and 28 DPI in beta cells ($p = 0.008$; Figure 3C).

Because we observed a decrease in insulin content in CVB3/28-infected pancreases, we examined the insulin secretion and maturation in mice infected with CVB3/28 or with CVB-TD RNA populations obtained from previously infected pancreases. We first semi-quantified the expression of Ins1 gene mRNA, coding for the preproinsulin (Figure 4A). We showed that there was no decrease nor increase in Ins1 gene mRNA expression following CVB3/28 infection in mice at 3 or 28 DPI (Figure 4A). Proinsulin concentration in the plasma increased during acute and chronic pancreatitis ($p = 0.0079$; Figure 4B). An insulinemia peak was observed at 3 DPI, with a significant decrease thereafter ($p = 0.0079$; Figure 4C). Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 2 (PCSK2, gene coding for the Pro-hormone Convertase 2, the enzyme processing proinsulin into insulin) mRNA expression levels decreased between acute and chronic infection with CVB3/28 as well as with CVB-TD RNA populations ($p < 0.0022$; Figure 4D). Autoantibodies against GAD65 and IA2 were elevated during infection with CVB3/28 or inoculation of CVB-TD RNA populations, at both the acute and chronic stages ($p < 0.033$, Figure 2E).

Together, these results show that CVB3/28 infection and the inoculation of CVB-TD RNA populations in mice decrease the insulin secretion, possibly by an impairment of proinsulin to insulin maturation, and induce the production of autoantibodies against islet cells during chronic infection.

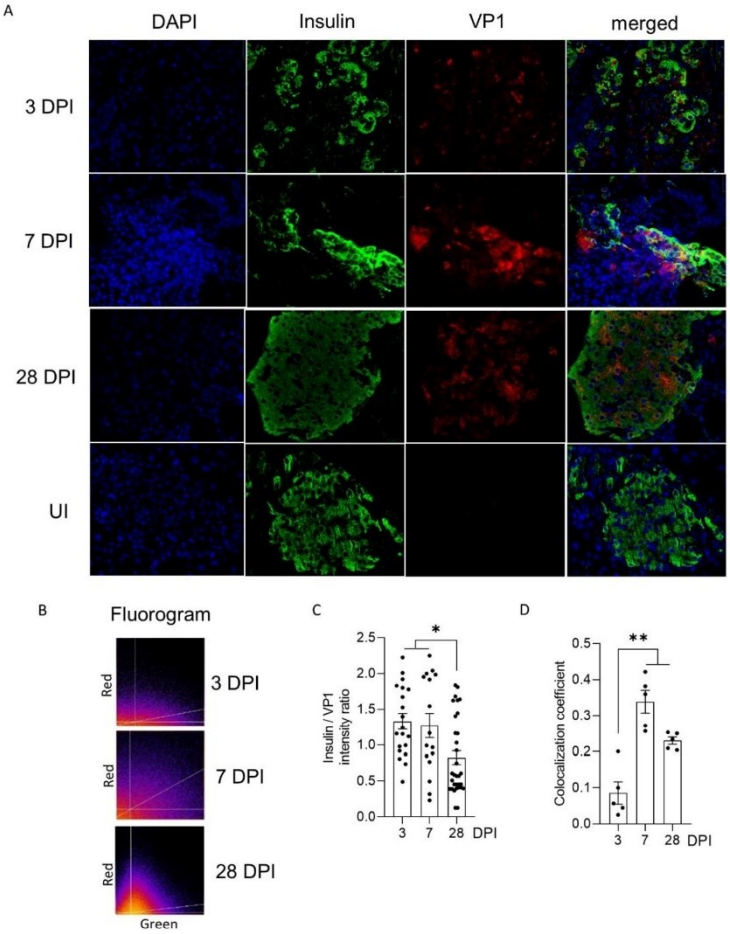


Figure 3. Impact of CVB3/28 infection on the insulin content of pancreatic islet cells of DBA/2J mice. (**A**) An immunofluorescence assay was performed using monoclonal antibody for CVB3/28 VP1 and insulin in thin sections of the pancreas, from 3 to 28 days post-infection (DPI), and from uninfected mice (original magnification: ×200). (**B**) On the fluorograms, green intensities are plotted on the x-axis, and red intensities are plotted on the *y*-axis. The white lines in both plots represent threshold levels applied to both channels for subsequent analysis of the volume. The third line represents a correlation curve using colocalization analyses with JACop. All pixels above and on the right are possible colocalized points. (**C**) Insulin/VP1 intensity ratio was measured for cells positive for insulin from 3, 7 and 28 DPI (n= 20, 16 and 32 regions of interest (ROIs) respectively). (**D**) Colocalization coefficient (Pearson) was calculated using QuPath from 3 to 28 DPI in 1 to 3 islets per slice (n = 5, each dot represents an islet), from 3 to 28 DPI. The results shown are representative of 3 mice at each indicated time point. ROIs (were chosen within the positive cells for insulin, and colocalization was monitored with the JACoP plugin of ImageJ (manual thresholding). Data represent mean +/− SEM. Mann-Whitney Test. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. VP1: viral protein 1. UI: uninfected. DPI: days post-infection.

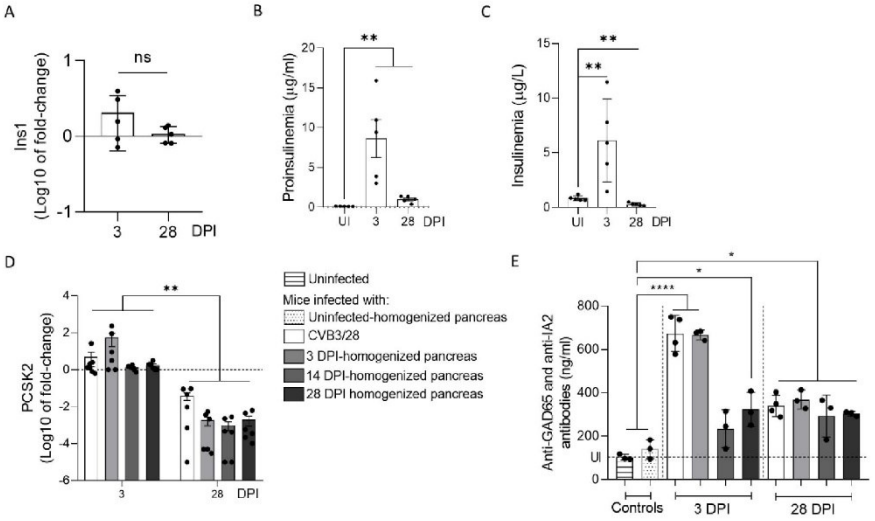


Figure 4. Impact of CVB3/28 and CVB-TD RNA populations' infections on insulin maturation in pancreases of immunocompetent mouse. (**A**) Insulin (Ins1) mRNA levels' fold-changes were measured by RT-qPCR in the pancreases of CVB3/28-infected mice at 3 and 28 days post-infection (DPI) (n = 5). (**B**) Using specific murine proinsulin ELISA kit, proinsulin levels in blood were measured in uninfected mice and CVB3/28-infected mice at 3 and 28 DPI (n = 5). (**C**) Blood insulin was measured using a specific ELISA kit in uninfected and CVB3/28-infected mice at 3 and 28 DPI (n = 5). (**D**) PC2 (PCSK2) mRNA levels' fold-changes were quantified by RT-qPCR in pancreases of CVB3/28-infected mice and of mice inoculated with homogenized pancreases from 3, 14 and 28 DPI (n = 5). (**E**) Anti-GAD65 and anti-IA2 antibodies levels in the blood of uninfected mice, CVB3/28-infected mice and of mice inoculated with homogenized pancreases from uninfected, 3, 14 and 28 DPI mice, at 3 and 28 DPI (n = 3 to 4) (uninfected mice were sacrificed at 3 or 14 DPI). Data represent mean +/− SEM for three independent experiments. Mann–Whitney U test; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$. ns: non-significant. DPI: days post infection. Ins1: preproinsulin gene. PCSK2: Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 2. GAD65: glutamic acid decarboxylase 65. IA-2: islet antigen 2.

3.5. CVB-TD50 RNA Transfection into INS-1-E1 Cells Decreases PCSK2 mRNA Expression and Impairs Insulin Secretion

Because we showed an impairment of insulin maturation in mice infected with CVB3/28 and CVB-TD RNA forms (Figures 3 and 4), we performed infection and transfection of the beta cell line of rodent INS-1, with the CVB3/28 strain at a MOI of 1 and with CVB-FL or CVB-TD synthetic RNA, respectively. First, we showed that CVB3/28 or synthetic RNA of CVB-FL and CVB-TD50 had active replication activity in INS-1 cells at 24 h post-infection ($p < 0.02$; Figure 5A–C). To investigate the translation efficiency of CVB3/28 infection or CVB-FL or CVB-TD50 transfection in INS-1 cells, we performed Western blot analysis. We showed that viral capsid protein (VP1) was expressed at 24 h post infection/transfection with CVB3/28 or CVB-FL/TD50 in INS-1 cells, thus demonstrating efficient translation activities (Figure 5B–D). Moreover, we showed that CVB3/28 infection of INS-1 cells results in the cleavage of host factor eIF4G by viral proteinase, as previously shown (Figure 5B) [10]. We used Poly (I:C) transfection of INS-1 cells to induce an inflammatory response, mimicking a viral infection without viral protease activity [27]. PCSK2 mRNA expression decreased at 24 h post-infection or after CVB-FL or CVB-TD transfection, but not after Poly (I:C) transfection ($p = 0.002$; Figure 5E). As shown

in Figure 5E, ISG15 mRNA expression increased at 24 h post transfection with Poly (I:C), as previously shown [27], but not after CVB3/28 infection or CVB-FL/TD50 transfection ($p = 0.002$, Figure 5F). INS-1 cells infected with CVB3/28 responded like uninfected controls did, with respect to the ability to release insulin below 2 mM glucose conditions (Figure 5G). However, the insulin release in response to high glucose (25 mM) stimulation was hampered in CVB-infected INS-1 cells compared to mock-infected cells ($p < 0.0001$; Figure 5G). INS-1-cells transfected with CVB-FL or TD50 RNA forms did not increase their insulin secretion in response to high glucose stimulation, similarly to CVB3/28-infected cells (Figure 5F). Interestingly, the insulin response to high glucose stimulation was maintained following Poly (I:C) transfection, despite the inflammatory response mimicking a viral infection ($p = 0.042$, Figure 5G). Taken together, these results showed that the replication and translation activities of CVB-TD50 RNA forms decrease PCSK2 mRNA expression and the insulin response of rodent beta cells, possibly by proteinase-induced cleavage activities.

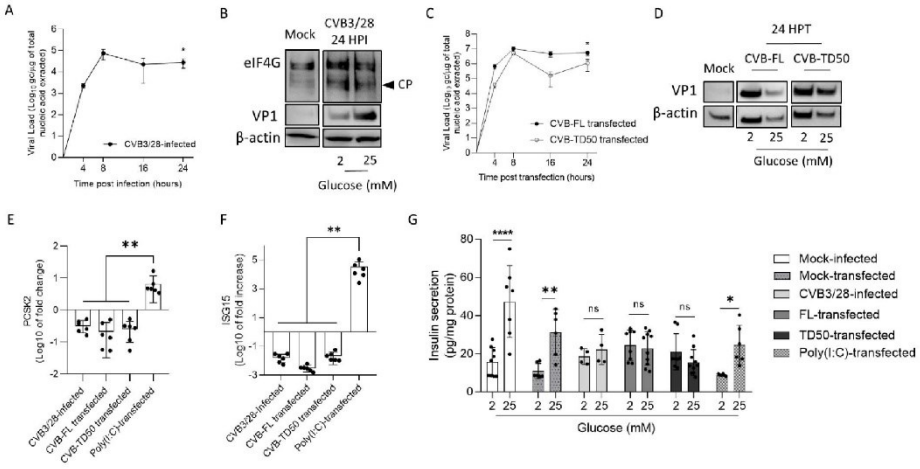


Figure 5. Infection by CVB3/28 and transfection by CVB-TD50 RNA forms decrease PCSK2 mRNA expression and abolish the insulin response to glucose stimulation in beta cells of rodents. (**A**) Infectious CVB3/28 virus loads in the supernatant of INS-1 cells at indicated time points post-infection. (**B**) Western blot analyses showed the cleavage of eIFG4, a eukaryote translation factor, viral protein 1 (VP1) and β-actin expression in mock-infected and CVB3/28-infected pancreases at 24 h post-infection (24 HPI) in INS-1 cells. (**C**) Kinetics of viral RNA replication activity after CVB-FL and CVB-TD50 RNA forms (1 µg) transfection of INS-1 cells measured by RT-qPCR. (**D**) Western blot analysis of CVB3/28 viral protein 1 (VP1) and β-actin in mock-infected and CVB-FL/TD50-transfected INS-1 cells at 24 h post-transfection (24 HPT). (**E**) PC2 (PCSK2) mRNA level fold-changes (RT-qPCR) in INS-1 cells infected with CVB3/28, or transfected with CVB-FL/TD50 or Poly (I:C). (**F**) ISG15 mRNA level fold-changes (RT-qPCR) in INS-1 cells infected with CVB3/28, or transfected with CVB-FL/TD50 or Poly (I:C). (**G**) Glucose stimulated the insulin secretion assay of INS-1 cells following infection of CVB3/28, transfection of CVB RNA forms or Poly (I:C), or mock-infected/transfected cells (triplicate). Data are expressed as pg of insulin in supernatant per mg of total protein content. ANOVA test (panel (**G**)) or Mann–Whitney U test (panels (**A**,**C**,**E**,**F**)); *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$. Not specified or ns: non-significant. Data represent mean +/− SD of three independent experiments. CVB-FL/TD: full-length or 5′ terminally deleted coxsackievirus. HPI: hours post-infection. HPT: hours post-transfection. CP: cleavage product. VP1: viral capsid protein 1. eIF4G: Eukaryotic translation initiation factor 4G.

4. Discussion

Emergence of 5′ terminally deleted coxsackievirus-B RNA forms (CVB-TD) have been associated with the development of acute or chronic pathologies in humans and in experimental mouse models [2,4]. CVB-TD has been previously detected in the heart tissues and peripheral blood of patients with acute myocarditis or chronic dilated cardiomyopathy [10,25,28]. In cardiac cells, the CVB-TD RNA population's infection induced the disruption of dystrophin by sufficiently maintained viral proteinase-induced cleavage activities [10]. Moreover, CVB-TD RNA forms have been detected in mouse pancreases during chronic infection, and have been associated with low insulin content in the pancreas or a decrease in insulin expression [9,11]. Using an immunocompetent mouse model of systemic CVB3/28 infection, we recently showed that a persistent pancreatic infection by these CVB-TD RNA forms was associated with an insulin content decrease [11]. In the present investigation, we designed our successive in vivo and in vitro experiments to explore the direct impact of the replication and translation activities of major CVB-TD RNA forms onto the insulin metabolism in rodent pancreatic beta cells.

We first evidenced the early emergence and maintenance of major CVB-TD populations in pancreases of CVB3/28-infected DBA/2J mice, characterized by low levels of viral replicative activities (Figure 1, Table 1). These results are concordant with the description of such persistent CVB3-TD RNA forms in the hearts of patients with dilated cardiomyopathies or in mouse hearts [10,11,28]. Interestingly, we showed that the inoculation of CVB-TD populations from previously infected pancreases into immunocompetent enterovirus-free mice re-induced successively acute and persistent pancreatic infections, with low viral translation activities, as demonstrated by low VP1 expression levels (Figure 2). These original findings demonstrated the pancreatic tropism of CVB-TD RNA populations and their ability to induce pancreatitis in newly infected mice, showing the pancreatic pathogenicity of these viral forms, as in the classical Koch's postulates [29].

In mouse pancreases, we showed that CVB-TD RNA populations displayed low replication activity levels, still maintaining persistent infection with translation activity (Figure 2, Table 1). We observed that the VP1 expression colocalized with a decrease in insulin content, as shown by the decrease in insulin staining intensity and the colocalization between VP1 and insulin staining (Figure 3). Such a low-grade infection of beta cells is concordant with VP1 detection in a small number of beta cells of patients with both recent-onset and longer-duration T1D [7,30,31]. Moreover, other pancreatic-type cells were positive for VP1 in this model, either by immunohistochemistry or by immunofluorescence (Figures 2 and 3). These cells could be ductal cells, which have been shown to be infected by various CVBs in vitro [32,33]. In this context, the host and virus interacted without the development of large-scale beta cell lysis. In cases of T1D associated with CVB infection, the emergence of CVB-TD associated with a moderate inflammatory response could result in a chronic persistent infection with sufficient levels of viral protein synthesis activities, reducing the insulin secretion. Interestingly, in infected mouse pancreases, we showed a decrease in pro-hormone convertase 2 (PCSK2 gene, coding PC2 protein) mRNA, associated with a decrease in insulin plasmatic concentration and an increase in proinsulin plasmatic concentration during persistent infection (Figure 4). Taken together, these results obtained in persistently CVB-TD infected murine pancreas indicated an impairment of insulin maturation, which could be the consequence of a decrease in PCSK2 mRNA transcriptional levels (Figure 4). We hypothesized that the impaired processing of proinsulin into insulin could be the direct consequence of viral proteinase cleavage activities of specific transcription/translation host cell factors (Supplementary Figure S1). Low viral translation activities during the persistent infection of pancreatic beta cells could be sufficient to disrupt host cell proteins, such as eIF4G (eukaryote translation factor 4G) or TBP (TATA box binding protein, a transcription factor), both known to be cleaved by enteroviral proteinases (Figures 1 and 2, Table 1) [10,21,34]. Moreover, DNA hypermethylation was also demonstrated by some authors during persistent CVB4 infection of beta cells in vitro, decreasing host cell transcription levels [20]. Transcriptomic and proteomic approaches are needed

to determine the mandatory host cell factors implicated in PCSK2 mRNA production and translation in pancreatic beta cells, which might potentially be cleaved by CVB proteinases.

To assess the link between the replication activities and insulin maturation impairment of major CVB-TD forms, synthetic CVB-TD50 RNA forms were transfected into cultured rodent beta cells (INS-1 cells). Remarkably, we showed that CVB-TD50 RNA forms with replicative and translation activities induced a decrease in PCSK2 mRNA expression, impairing the insulin secretion in response to high glucose stimulation (Figure 5; Supplementary Figure S1). Recently, it was shown that mRNA expression of insulin and C-peptide concentrations, a cleavage product of insulin processing, were decreased during persistent CVB4-E2 infection of human primary pancreatic ductal cells [33]. Accordingly, other authors reported that PCSK2 mRNA expression was decreased during persistent infection of beta cells with CVB4 [20]. Herein, we showed that CVB3/28 infection and CVB-TD50 RNA forms' transfection diminished the insulin secretion in response to high glucose concentration in INS-1-E1 cells (Figure 5). Interestingly, the transfection of Poly (I:C) in cultured beta cells increased ISG15 mRNA expression levels without a complete shut-down of the insulin response to high glucose stimulation levels (Figure 5), demonstrating that the antiviral inflammatory response alone was not sufficient to abolish the insulin secretion or its processing. By comparison, transfection of CVB-TD50 RNA forms did not induce an ISG15 mRNA expression increase, but maintained viral translation activities, as demonstrated by Western blotting analyses of VP1 levels (Figure 5). These results indicated that viral replication and translation activities, without an antiviral inflammatory response, could directly impair the insulin secretion or maturation of cultured beta cells. Moreover, we showed that CVB3/28 infection in INS-1-E1 cells resulted in eIF4G cleavage, demonstrating viral proteinase activities (Figure 5). Taken together, these findings suggested that the insulin maturation impairment by CVB-TD50 RNA forms might be a consequence of the viral proteinase activities rather than a consequence of beta cells' inflammatory responses in CVB-infected rodent beta cells (Figure 5) [10,35].

Molecular mimicry mechanisms between CVB protein epitopes and host beta cell proteins recognized by autoreactive T cells have been reported in several studies [17,36,37]. Possible cross-reactivity with GAD65 or IA-2 epitopes has also been reported [15,37]. The combination of chronic infection of beta cells with low inflammation could enhance autoreactive T cell populations [1,20]. In our model, autoantibodies against GAD65 and IA-2 were increased during acute and chronic infection, even after the inoculation of CVB-TD populations (Figure 4). The low replicating CVB-TD populations could trigger the secretion of such autoantibodies by a viral protein synthesis and chronic viral antigen presentation [15,36]. Moreover, we showed that proinsulin plasma levels, an autoantigen detected during T1D onset, were also increased after acute and chronic CVB3/28 infections in mice (Figure 4) [19]. Further investigations are needed to explore the secretion of CVB-TD-induced autoantibodies against beta cells.

Finally, our results showed that CVB-TD RNA forms could be key players in T1D development. Using our experimental approach applied to a human model, such as the human beta-cell line EndoC-BH1 or hiPSC-derived into beta cells, could increase the knowledge of CVB-TD-induced pathogenesis in T1D. Finally, CVB RNA populations' clearance could be a potential therapeutic target in T1D patients. Since persistent CVB RNA forms have low replication activities and low encapsidation rates (Table 1), antiviral therapies targeting viral polymerase or encapsidation might be less efficient than potential immunotherapy strategies to restore antiviral innate responses, specifically type I interferon activation pathways [11,38]. Such immunotherapies could achieve viral clearance of CVB-TD RNA forms in pancreatic beta cells, thus limiting the enterovirus-induced development of T1D in the young [39]. Moreover, a primary vaccination against CVB during childhood could also prevent early, acute and persistent infections of CVB-TD RNA forms and subsequent chronic lesions of the endocrine pancreas tissues [11]. Secondary vaccination, after CVB infection, might also prevent re-infection and reactivation of CVB viral RNA replication activities. New emerging mRNA vaccination strategies could target multiple CVB types

and induce an innate immune response sufficient to clear acute and chronic enterovirus infections in humans. A CVB vaccine, which is currently undergoing clinical trials in Finland (Provention Bio, Red Bank, NJ, United States), was developed with a focus on the involvement of CVBs in diabetes (PROVENT clinical trial).

In conclusion, our results show that the emergence and maintenance of major CVB-TD RNA replicative forms in beta pancreatic cells can play a direct, key role in the pathophysiological mechanisms leading to the development of T1D. These original findings should stimulate the development of new anti-CVB vaccination strategies to prevent acute infection in the young, or to induce a viral clearance in persistently infected human pancreases.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14122781/s1, Figure S1: Schematic representation of the scientific hypothesis; Figure S2: Histological scoring and Viral Protein 1 positivity in pancreas of DBA/2J mice at 7 days post infection =; Figure S3: Western blot intensity analyses.

Author Contributions: Conceptualization, L.A. and F.B.; methodology, D.C. and F.B.; software, D.C.; validation, D.C., F.B., P.F. and L.A.; formal analysis, D.C., A.G., F.B. and A.-L.L.; investigation, D.C., F.B., A.G. and A.-L.L.; resources, D.C., A.-L.L., L.H. and N.B.; data curation, D.C., A.-L.L., L.H. and N.B.; writing—original draft preparation, D.C., F.B. and A.G.; writing—review and editing, D.C., F.B., P.F. and L.A.; visualization, D.C. and F.B.; supervision, P.F. and L.A.; project administration, L.A.; funding acquisition, D.C., F.B. and L.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a grant from "Fédération Française de Cardiologie" (FFC grant 2019 "Etude CardioVir") and by a local research grant for emerging research teams from the University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), France.

Institutional Review Board Statement: The protocol was approved by the committee of animal experiments of the Reims Champagne-Ardenne Academy (accreditation number 56) and then by Ministry of Advanced Education and research (permits number #5463-201704171500306).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank Christine Terryn for her skillful assistance in confocal analyses (URCACyt, Reims) and the animal facility department team (URCAnim) of the Faculty of Pharmacy and Medicine (Reims). We thank Bertrand Blondeau and Ghislaine Guillemain for their gift of INS-1-E1 cells.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Akhbari, P.; Richardson, S.J.; Morgan, N.G. Type 1 Diabetes: Interferons and the Aftermath of Pancreatic Beta-Cell Enteroviral Infection. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1419. [CrossRef] [PubMed]
2. Alidjinou, E.K.; Sané, F.; Engelmann, I.; Geenen, V.; Hober, D. Enterovirus persistence as a mechanism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Discov. Med.* **2014**, *18*, 273–282. [PubMed]
3. Jaïdane, H.; Hober, D. Role of Coxsackievirus B4 in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Diabetes Metab.* **2008**, *34*, 537–548. [CrossRef] [PubMed]
4. Tracy, S.; Drescher, K.M.; Chapman, N.M. Enteroviruses and Type 1 Diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2011**, *27*, 820–823. [CrossRef]
5. Nekoua, M.P.; Bertin, A.; Sane, F.; Alidjinou, E.K.; Lobert, D.; Trauet, J.; Hober, C.; Engelmann, I.; Moutairou, K.; Yessoufou, A. Pancreatic Beta Cells Persistently Infected with Coxsackievirus B4 Are Targets of NK Cell-Mediated Cytolytic Activity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2020**, *77*, 179–194. [CrossRef]
6. Sarmiento, L.; Medina, A.; Aziz, K.; Anagandula, M.; Cabrera-Rode, E.; Fex, M.; Frisk, G.; Cilio, C.M. Differential Effects of Three Echovirus Strains on Cell Lysis and Insulin Secretion in Beta Cell Derived Lines: Echoviral Infection on Beta Cell Derived Lines. *J. Med. Virol.* **2016**, *88*, 971–978. [CrossRef]
7. Krogvold, L.; Edwin, B.; Buanes, T.; Frisk, G.; Skog, O.; Anagandula, M.; Korsgren, O.; Undlien, D.; Eike, M.C.; Richardson, S.J.; et al. Detection of a Low-Grade Enteroviral Infection in the Islets of Langerhans of Living Patients Newly Diagnosed with Type 1 Diabetes. *Diabetes* **2015**, *64*, 1682–1687. [CrossRef]

8. Glenet, M.; Heng, L.; Callon, D.; Lebreil, A.-L.; Gretteau, P.-A.; Nguyen, Y.; Berri, F.; Andreoletti, L. Structures and Functions of Viral 5′ Non-Coding Genomic RNA Domain-I in Group-B Enterovirus Infections. *Viruses* **2020**, *12*, 919. [CrossRef]
9. Tracy, S.; Smithee, S.; Alhazmi, A.; Chapman, N. Coxsackievirus Can Persist in Murine Pancreas by Deletion of 5′ Terminal Genomic Sequences: Coxsackievirus Persistence in the Pancreas. *J. Med. Virol.* **2015**, *87*, 240–247. [CrossRef]
10. Bouin, A.; Gretteau, P.-A.; Wehbe, M.; Renois, F.; N'Guyen, Y.; Lévêque, N.; Vu, M.N.; Tracy, S.; Chapman, N.M.; Bruneval, P.; 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* **2019**, *139*, 2326–2338. [CrossRef]
11. Callon, D.; Lebreil, A.-L.; Bouland, N.; Fichel, C.; Fornès, P.; Andreoletti, L.; Berri, F. Early Emergence of 5′ Terminally Deleted Coxsackievirus-B3 RNA Forms Is Associated with Acute and Persistent Infections in Mouse Target Tissues. *Vaccines* **2022**, *10*, 1203. [CrossRef] [PubMed]
12. Atkinson, M.A.; Eisenbarth, G.S.; Michels, A.W. Type 1 Diabetes. *Lancet* **2014**, *383*, 69–82. [CrossRef] [PubMed]
13. Fujinami, R.S.; von Herrath, M.G.; Christen, U.; Whitton, J.L. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 80–94. [CrossRef] [PubMed]
14. Härkönen, T.; Lankinen, H.; Davydova, B.; Hovi, T.; Roivainen, M. Enterovirus Infection Can Induce Immune Responses That Cross-React with Beta-Cell Autoantigen Tyrosine Phosphatase IA-2/IAR. *J. Med. Virol.* **2002**, *66*, 340–350. [CrossRef]
15. Lönnrot, M.; Hyöty, H.; Knip, M.; Roivainen, M.; Kulmala, P.; Leinikki, P.; Akerblom, H.K. Antibody Cross-Reactivity Induced by the Homologous Regions in Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) and 2C Protein of Coxsackievirus B4. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Clin. Exp. Immunol.* **1996**, *104*, 398–405. [CrossRef]
16. Hober, D.; Sauter, P. Pathogenesis of Type 1 Diabetes Mellitus: Interplay between Enterovirus and Host. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2010**, *6*, 279–289. [CrossRef]
17. Härkönen, T.; Paananen, A.; Lankinen, H.; Hovi, T.; Vaarala, O.; Roivainen, M. Enterovirus Infection May Induce Humoral Immune Response Reacting with Islet Cell Autoantigens in Humans. *J. Med. Virol.* **2003**, *69*, 426–440. [CrossRef]
18. Schulte, B.M.; Kramer, M.; Ansems, M.; Lanke, K.H.W.; van Doremalen, N.; Piganelli, J.D.; Bottino, R.; Trucco, M.; Galama, J.M.D.; Adema, G.J.; et al. Phagocytosis of Enterovirus-Infected Pancreatic-Cells Triggers Innate Immune Responses in Human Dendritic Cells. *Diabetes* **2010**, *59*, 1182–1191. [CrossRef]
19. Breuer, T.G.K.; Menge, B.A.; Banasch, M.; Uhl, W.; Tannapfel, A.; Schmidt, W.E.; Nauck, M.A.; Meier, J.J. Proinsulin Levels in Patients with Pancreatic Diabetes Are Associated with Functional Changes in Insulin Secretion Rather than Pancreatic Beta-Cell Area. *Eur. J. Endocrinol.* **2010**, *163*, 551–558. [CrossRef]
20. Nekoua, M.P.; Bertin, A.; Sane, F.; Gimeno, J.-P.; Fournier, I.; Salzet, M.; Engelmann, I.; Alidjinou, E.K.; Hober, D. Persistence of Coxsackievirus B4 in Pancreatic β Cells Disturbs Insulin Maturation, Pattern of Cellular Proteins, and DNA Methylation. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1125. [CrossRef]
21. Kundu, P.; Raychaudhuri, S.; Tsai, W.; Dasgupta, A. Shutoff of RNA Polymerase II Transcription by Poliovirus Involves 3C Protease-Mediated Cleavage of the TATA-Binding Protein at an Alternative Site: Incomplete Shutoff of Transcription Interferes with Efficient Viral Replication. *J. Virol.* **2005**, *79*, 9702–9713. [CrossRef] [PubMed]
22. Clark, M.E.; Lieberman, P.M.; Berk, A.J.; Dasgupta, A. Direct Cleavage of Human TATA-Binding Protein by Poliovirus Protease 3C in Vivo and in Vitro. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 1232–1237. [CrossRef] [PubMed]
23. Andréoletti, L.; Hober, D.; Becquart, P.; Belaich, S.; Copin, M.C.; Lambert, V.; Wattré, P. 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.* **1997**, *52*, 206–214. [CrossRef]
24. N'Guyen, Y.; Lesaffre, F.; Metz, D.; Tassan, S.; Saade, Y.; Boulagnon, C.; Fornes, P.; Renois, F.; Andreoletti, L. Enterovirus but Not Parvovirus B19 Is Associated with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy and Endomyocardial CD3, CD68, or HLA-DR Expression. *J. Med. Virol.* **2017**, *89*, 55–63. [CrossRef] [PubMed]
25. Glenet, M.; N'Guyen, Y.; Mirand, A.; Henquell, C.; Lebreil, A.-L.; Berri, F.; Bani-Sadr, F.; Lina, B.; Schuffenecker, I.; Andreoletti, L. Major 5′terminally Deleted Enterovirus Populations Modulate Type I IFN Response in Acute Myocarditis Patients and in Human Cultured Cardiomyocytes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11947. [CrossRef] [PubMed]
26. Lévêque, N.; Renois, F.; Talmud, D.; Nguyen, Y.; Lesaffre, F.; Boulagnon, C.; Bruneval, P.; Fornes, P.; Andréoletti, L. Quantitative Genomic and Antigenomic Enterovirus RNA Detection in Explanted Heart Tissue Samples from Patients with End-Stage Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 3378–3380. [CrossRef]
27. Baden, M.Y.; Fukui, K.; Hosokawa, Y.; Iwahashi, H.; Imagawa, A.; Shimomura, I. Examination of a Viral Infection Mimetic Model in Human IPS Cell-Derived Insulin-Producing Cells and the Anti-Apoptotic Effect of GLP-1 Analogue. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144606. [CrossRef]
28. 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* **2008**, *375*, 480–491. [CrossRef]
29. Hosainzadegan, H.; Khalilov, R.; Gholizadeh, P. The Necessity to Revise Koch's Postulates and Its Application to Infectious and Non-Infectious Diseases: A Mini-Review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *39*, 215–218. [CrossRef]
30. Hayakawa, T.; Nakano, Y.; Hayakawa, K.; Yoshimatu, H.; Hori, Y.; Yamanishi, K.; Yamanishi, H.; Ota, T.; Fujimoto, T. Fulminant Type 1 Diabetes Mellitus Associated with Coxsackievirus Type B1 Infection during Pregnancy: A Case Report. *J. Med. Case Rep.* **2019**, *13*, 186. [CrossRef]

31. Badia-Boungou, F.; Sane, F.; Alidjinou, E.K.; Ternois, M.; Opoko, P.A.; Haddad, J.; Stukens, C.; Lefevre, C.; Gueorguieva, I.; Hamze, M.; et al. Marker of Coxsackievirus-B4 Infection in Saliva of Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2017**, *33*, e2916. [CrossRef] [PubMed]
32. Sane, F.; Caloone, D.; Gmyr, V.; Engelmann, I.; Belaich, S.; Kerr-Conte, J.; Pattou, F.; Desailloud, R.; Hober, D. Coxsackievirus B4 Can Infect Human Pancreas Ductal Cells and Persist in Ductal-like Cell Cultures Which Results in Inhibition of Pdx1 Expression and Disturbed Formation of Islet-like Cell Aggregates. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2013**, *70*, 4169–4180. [CrossRef] [PubMed]
33. Alidjinou, E.K.; Engelmann, I.; Bossu, J.; Villenet, C.; Figeac, M.; Romond, M.-B.; Sané, F.; Hober, D. Persistence of Coxsackievirus B4 in Pancreatic Ductal-like Cells Results in Cellular and Viral Changes. *Virulence* **2017**, *8*, 1229–1244. [CrossRef] [PubMed]
34. Kempf, B.J.; Barton, D.J. Poliovirus 2A(Pro) Increases Viral MRNA and Polysome Stability Coordinately in Time with Cleavage of EIF4G. *J. Virol.* **2008**, *82*, 5847–5859. [CrossRef] [PubMed]
35. Perng, Y.-C.; Lenschow, D.J. ISG15 in Antiviral Immunity and Beyond. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 423–439. [CrossRef]
36. Marttila, J.; Juhela, S.; Vaarala, O.; Hyöty, H.; Roivainen, M.; Hinkkanen, A.; Vilja, P.; Simell, O.; Ilonen, J. Responses of Coxsackievirus B4-Specific T-Cell Lines to 2C Protein-Characterization of Epitopes with Special Reference to the GAD65 Homology Region. *Virology* **2001**, *284*, 131–141. [CrossRef]
37. Vreugdenhil, G.R.; Geluk, A.; Ottenhoff, T.H.; Melchers, W.J.; Roep, B.O.; Galama, J.M. Molecular Mimicry in Diabetes Mellitus: The Homologous Domain in Coxsackie B Virus Protein 2C and Islet Autoantigen GAD65 Is Highly Conserved in the Coxsackie B-like Enteroviruses and Binds to the Diabetes Associated HLA-DR3 Molecule. *Diabetologia* **1998**, *41*, 40–46. [CrossRef]
38. Chapman, N.M. Persistent Enterovirus Infection: Little Deletions, Long Infections. *Vaccines* **2022**, *10*, 770. [CrossRef]
39. Dunne, J.L.; Richardson, S.J.; Atkinson, M.A.; Craig, M.E.; Dahl-Jørgensen, K.; Flodström-Tullberg, M.; Hyöty, H.; Insel, R.A.; Lernmark, Å.; Lloyd, R.E.; et al. Rationale for Enteroviral Vaccination and Antiviral Therapies in Human Type 1 Diabetes. *Diabetologia* **2019**, *62*, 744–753. [CrossRef]

Supplementary material

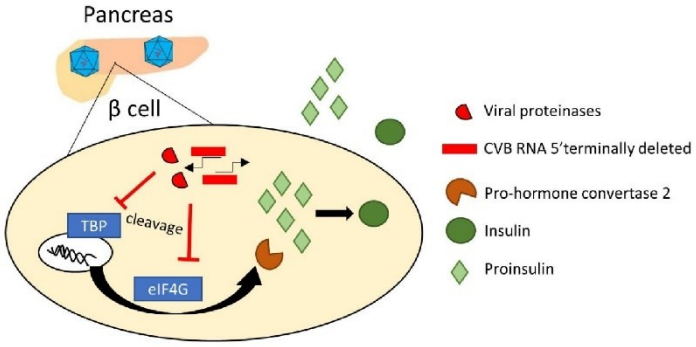


Figure S1 : **Schematic representation of the scientific hypothesis**. Replication activities of CVB-TD RNA forms produced low levels of viral proteins, sufficient to cleave host cells factors such as TBP or eIF4G. These viral proteinase cleavage activities could result in a decrease in PCSK2 enzymatic activity, with the accumulation of proinsulin and a decrease in insulin secretion.

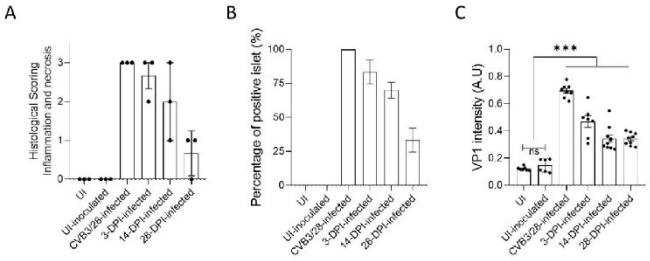


Figure S2: **Histological scoring and Viral Protein 1 positivity in pancreas of DBA/2J mice at 7 days post infection**. (A) Histological scoring for inflammation and necrosis in HES stained slices of pancreas, from uninfected or infected DBA/2J mice, or inoculated with homogenized pancreas from 3-DPI, 14-DPI or 28-DPI and uninfected mice (n=3). (B) Percentages of islets positive for VP1 in immunohistochemistry (n=3). (C) VP1 intensity on slices of pancreas (n=3, with two to three ROI per slice). Data presented as mean +/- SEM. Mann-Whitney test: ***= p<0.001. ns: non-significant. ROI: Region of interest. VP1: viral protein 1. UI: uninfected. CVB3: coxsackievirus B3. AU: arbitrary unit. DPI: days post infection.

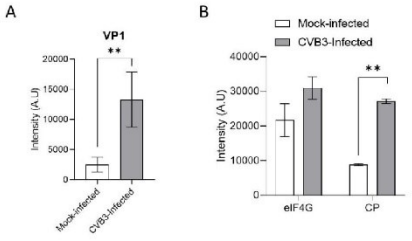


Figure S3: **Western blot intensity analyses**. (A) Viral protein 1 intensity after 24 hours of incubation (mock-infected) or CVB3/28 infection, at a Multiplicity of Infection of 1 (n=3). (B) eIF4G and its cleavage product intensities after 24 hours of incubation (mock-infected) or CVB3/28 infection, at a Multiplicity of Infection of 1 (n=2). Data presented as mean +/- SD. Mann-Whitney test: **= $p<0.01$. VP1: viral protein 1. UI: uninfected. CVB3: Coxsackievirus B3. AU: arbitrary unit. CP: cleavage product. eIF4G: Eukaryotic translation initiation factor 4 G.

Article 3 : Replicative Group-B Enterovirus populations deleted in the 5' non-coding region in domain-I of genomic RNA modulate activation of the type 1 interferon pathway and induce myocarditis

Au cours de l'infection cardiaque à CVB3/28 chez la souris DBA/2J, notre travail a consisté à : (i) étudier la dynamique d'émergence précoce des populations de CVB3/28 tronquées en région 5'NC dans le cœur et l'impact sur la réplication virale ; (ii) étudier la modulation de la réponse IFN-β en comparaison avec d'autres infections virales, après inoculation de populations virales cardiaques puis après transfection d'ARN viraux synthétiques chez la souris, et après transfection in vitro dans des cardiomyocytes humains ; (iii) étudier la réponse IFN-β et la pathogénèse cardiaque après inoculation ou transfection de populations virales tronquées en région 5'NC chez la souris, et dans un modèle de cardiomyocytes humains ; (iv) étudier l'impact d'un traitement immunomodulateur sur la pathogenèse cardiaque après infection par le CVB3/28 chez la souris DBA/2J.

Des populations majeures d'EV-B caractérisées par des délétions nucléotidiques en région 5'NC et allant jusqu'à 50 nucléotides ont été associées au développement de la myocardite aiguë et chronique chez la souris et chez l'Homme. Le développement d'une infection aiguë vers 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 IFN-1 serait réduite (cf. Article 1). La réponse immunitaire innée médiée par l'IFN-1 est une étape clé dans la progression de l'infection virale aiguë, qui peut évoluer vers la guérison ou l'infection chronique. L'importance des IFN-1 est mise en évidence par la variété des mécanismes utilisés par les virus à ARN(+) pour échapper ou inhiber leur induction, leur signalisation ou les protéines effectrices, et par les phénotypes délétères identifiés chez l'Homme et les souris présentant des mutations génétiques dans la production ou la signalisation des IFN. Il a été démontré que dans un modèle de souris infectées par un CVB3cardiotrope, une réponse IFN de type I faible entraînait une aggravation de la myocardite aigue. De plus, dans des cas de cardiomyopathie dilatée d'origine virale chez l'Homme, le traitement par Interféron-Bêta permet d'obtenir une clairance virale et une amélioration de la

fonction cardiaque. Il apparaît donc essentiel d'intensifier la recherche expérimentale afin d'étudier l'impact de la dynamique d'émergence des formes tronquées en région 5'NC des EV-B sur le profil et la cinétique de la réponse antivirale innée au cours de la myocardite aiguë.

Nous avons donc étudié chez la souris DBA/2J et *in vitro*, l'impact des formes tronquées en région 5'NC sur la production des IFN-1 dans le cœur.

Des activités de réplication génomique et de synthèse protéique virales dans le cœur ont été mises en évidence par RT-qPCR spécifique, technique de lecture de plage de lyse. En utilisant une technique de RACE-PCR couplée à une micro-électrophorèse (Agilent®), nous avons identifié dans les tissus cardiaques des populations virales tronquées et caractérisées par la perte de structures secondaires dans le domaine I (« *Cloverleaf* ») de l'ARN génomique, dès 8 heures après l'infection. Ces formes virales tronquées en 5'terminale maintenaient des activités de réplication génomique à bas bruit et de synthèse de protéines virales, sans formation de virions infectieux, jusqu'à 28 jours après l'infection.

Les proportions de ces formes virales tronquées étaient inversement corrélées à l'expression des ARNm et les concentrations d'IFN-β dans le cœur (respectivement, R^2=0.45; p=0.004 et R^2=0.52, p=0.002). Nous avons comparé la réponse IFN-β induite par le CVB3/28, par le Mengovirus (*Picornavirus* de rongeur cardiotrope) de souche sauvage ou muté Zn (inducteur d'IFN de type 1), et par l'injection de Poly(I:C) HMW (acide polyinosinique-polycytidylique de haut poids moléculaire), entre 8 heures et 72 heures après l'infection/injection. Nous avons montré que la réponse IFN-β induite par le CVB3/28 était faible et très transitoire en comparaison avec le Mengovirus Zn ou le Poly(I :C).

Nous avons ensuite inoculé les mélanges de populations virales, générées au cours de l'infection naturelle chez la souris dans le cœur à différents temps post infection, dans des souris naïves pour le CVB3/28. Les populations virales présentes à J3 (formes complètes et formes tronquées en région 5'NC) induisaient une myocardite aigue histologique et une augmentation de la réponse IFN-β, tandis que les populations virales maintenues à des temps plus tardifs (J14 et J28 ; uniquement des formes tronquées en région 5'NC) induisaient une myocardite histologique sans augmentation de la réponse IFN-β. Ces résultats montrent que les quasi-espèces virales présentes à la phase chronique de l'infection, ayant émergées précocement dans le cœur, n'induisent pas de réponse IFN-1, mais infectent les cellules cibles cardiaques et reproduisent la pathologie cardiaque chez la souris.

Des ARN synthétiques de CVB3 porteurs de délétions progressive en 5'terminale ont été générés *in vitro* et transfectés dans des cardiomyocytes primaires humains (HCM) et dans des souris DBA/2J. Ces modèles *in vitro* et *in vivo* ont confirmé l'effet de régulateur négatif des formes majoritaires d'EV-B tronqués de 37 à 50nt sur l'induction de la voie des IFN-β. De plus, cette stratégie *in vitro* a permis d'identifier les tige-boucles "c" et/ou "d" du domaine I de l'ARN viral (feuille de trèfle) comme étant des structures génomiques virales essentielles dans l'induction de la voie des IFN-β, et des voies de signalisation en aval telles que celle des gènes stimulés par l'interféron (ISG56).

L'induction de la réponse IFN-1 par un agoniste non spécifique, le Poly(I:C), après l'infection des souris DBA/2J a permis une réduction significative des niveaux de charge virale des populations tronquées ($p=0.029$) ainsi qu'une diminution des lésions cardiaques histologiques ($p=0.016$) et du taux de mortalité ($p=0.05$) chez les souris. Ces résultats démontrent le rôle majeur de l'activation de la voie des IFN-1 dans la clairance des formes virales à ARN tronqué et pour contrôler l'infection cardiaque à EV-B chez la souris DBA/2J.

En résumé, nous avons montré pour la première fois l'émergence précoce de populations majoritaires d'EV-B tronqués en région 5'NC, dont les proportions élevées peuvent réguler négativement l'activité de réplication génomique virale et les niveaux d'IFN-1 dans le cœur. Ces deux mécanismes font potentiellement partie d'une stratégie d'échappement à la réponse immunitaire innée de l'hôte, permettant le développement de l'infection aiguë puis persistante dans le cœur, et l'évolution vers des pathologies chroniques (cardiomyopathie dilatée).

L'ensemble de ces résultats permet une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires entourant l'émergence des formes virales tronquées en région 5'NC dans les infections aigues à EV-B et permettra d'ouvrir la voie vers des thérapies ciblées antivirales et immunomodulatrices dans les infections aigues et chroniques à EV-B.

1 **Title - Draft**

2 **Replicative Group-B Enterovirus populations deleted in the 5' non-coding**
3 **region in domain-I of genomic RNA modulate activation of the type 1**
4 **interferon pathway and induce myocarditis**
5
6
7 D Callon[1,2+], M Glenet[1+], A-L Lebreil[1], L Heng[1], N Bouland[2], C Fichel[2], P Fornes[1,2], F Berri[1+],

8 L Andreoletti[1,3*+]

9 1 University of Reims Champagne Ardenne, Cardiovir EA-4684, Reims, France

10 2 Academic Hospital of Reims, Robert Debré, Pathology Department, Reims, France

11 3 Academic Hospital of Reims, Robert Debré, Virology Department, Reims, France

12
13 *Adresses for Correspondance :
14 Laurent Andreoletti, MD, PhD

15 Laboratoire de Virologie Médicale et Moléculaire, Hôpital Robert Debré Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex,
16 France

17 Tel: (+33) 3 26 78 77 02

18 Email: landreoletti@chu-reims.fr

19 + These authors contributed equally to this work

20

Abstract:

The early emergence of major 5'-terminally deleted RNA forms of group B coxsackievirus (CVB-TD) has been associated with the development of myocarditis in mice and humans. Interferon-β (IFN-β) signaling is known to be critical for an efficient innate immune response against CVB-induced myocarditis. However, the interactions between the CVB-TD RNA forms and IFN- β signaling in the heart are still unknown. In a model of CVB3/28-induced myocarditis in immunocompetent mice, early-emerging cardiac CVB-TD RNA forms were a replicating population with impaired IFN-β production. These cardiac CVB-TD populations without full-length viral RNA forms ("helper" virus) induced acute and chronic myocarditis when inoculated in naive mice. Transfection of various synthetic CVB-TD RNA forms in mice and in human cardiomyocytes showed that deletions affecting secondary structures of 5'terminal CVB3-RNA domain I, specifically stem-loops "c"/"d", impair directly the innate immune sensing in cardiomyocytes during myocarditis. Finally, CVB3-infected DBA/2J mice were treated with Poly(I:C), a nonspecific agonist of TLR3 (Toll-like-receptors) and RLR (RIG -I-like-receptors), restoring IFN-β production. This IFN-β production significantly reduced the replication of CVB-TD RNA forms, histological lesions in the heart of mice and mortality. In conclusion, our results provide new insights into the role of early-emerging replicative CVB-TD RNA forms as key pathophysiological players in CVB-induced myocarditis.

Introduction

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

EV-B are non-enveloped viruses, with single-stranded positive-sense RNA genome of approximately 7,400 nucleotides[1]. EV-B RNA genome is flanked on the 5' end by a conserved untranslated region (5'UTR) which is crucial for initiation of viral replication and translation activities[1]. A Coxsackievirus-B2 harboring 5'terminally deleted (CVB-TD) population ranging from 22 to 36 nucleotides (nt) was found in the heart of a patient who died of fulminant myocarditis[5]. Since 2016, our team identified by NGS or RACE-PCR assays major EV-B populations characterized by 5'UTR deletions ranging from 8 to 50nt (EVB-TD), either alone or associated with low proportions of full-length viruses in acute myocarditis or DCM human samples[6–8]. Similarly, major CVB-TD populations have been found in persistent cardiac and pancreatic infections in immunocompetent mouse models[9,10]. These EVB-TD populations were characterized by a reduction in ratios of positive to negative [(+)/(−)] RNA strands, and low viral protein synthesis activities[6,8,10,11]. Taken together these findings suggest that EVB-TD populations are associated with the development of acute or chronic myocarditis in humans and mouse models[12].

Reported deletions within the 5'UTR of EV-B forms are known to affect functional secondary-structural elements of the RNA domain I (cloverleaf)[11,13,14]. Leveque et al. demonstrated a reduced genomic replicative capacity of these EVB-TD RNA forms which was explained by a disturbed binding of cellular factor Poly(rC)-binding protein 2 and viral factor polymerase 3CD

64 on the 5'UTR domain I secondary structure[11]. Viral genome maintenance is a key step to
65 develop acute phase of infection and to establish viral RNA persistence in cardiac cells. To
66 achieve viral genome maintenance and long-lasting detection of EV-B in the heart, low-levels
67 replication and translation activities of naturally produced 5'TD viruses might be associated
68 with the capacity to modulate innate immunity activation[15,16].
69 The innate immune response mediated by type 1 interferon (IFN) is known to be crucial in the
70 progression of acute viral myocarditis, which may evolve toward either healing or chronic
71 persistent infection[15]. This crucial role is evidenced by the variety of mechanisms used by
72 RNA(+) viruses to evade or inhibit IFN induction, signalling or effector functions[17–19]. It was
73 reported that in a CVB3 mouse model, a reduced type 1 IFN response resulted in worsening of
74 myocarditis[20]. Deletions into the 5'UTR of EV-B populations could modify the RNA
75 secondary-structural elements recognized by RIG-I-like-receptors (RLR, such as Retinoic-
76 inducible gene I, RIG-I or Melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5) which are
77 major innate immune sensors during EV-B acute infections, resulting in a modulation of viral
78 RNA sensing and type 1 IFN signaling pathway activation[12,21]. We recently showed that cardiac
79 and pancreatic acute CVB3/28 infections in immunocompetent mice resulted in a low IFN-β
80 response in situ[10]. To date, the impact of 5'TD RNA forms on type 1 IFN response remains to
81 be investigated during EV-B-induced acute myocarditis.
82

In the present report, we first examined the impact of early emergence of replicative CVB-TD RNA forms on cardiac type 1 IFN response during a CVB3/28-induced myocarditis in an immunocompetent DBA/2J mouse model. Next, to investigate the direct role of CVB-TD RNA forms on the modulation of IFN-β pathway activation and on acute myocarditis pathogenesis, synthetic CVB-TD RNA forms were transfected alone in DBA/2J mice, then in human cardiomyocytes. Finally, we used Poly(I:C), an unspecific agonist of TLR3 (Toll-like-receptors) and RLR, to examine the impact of type 1 IFN pathway restoration on CVB-TD RNA forms replication and pathogenicity.

Results

Early emergence of 5'terminally deleted CVB populations modulates type 1 interferon response

To investigate the dynamic of 5'terminally deleted (CVB-TD) viral population's emergence in mice, we first quantified total CVB3 RNA load levels in hearts (Fig. 1a). Following the first peak of viremia at 16 HPI, viral loads in the heart exhibited an increase until 48 HPI (Fig. 1a). Total cardiac viral RNA loads exhibited a decrease until 28 DPI but remained detectable with values under or near our threshold (Fig. 1a). Progeny virus production was estimated by classical PFU assay, demonstrating a peak at 48 HPI with an absence of detectable infectious particles after 14 DPI (Fig. 1b). To determine the dynamics of emergence of 5'TD viral populations, we used a previously validated RACE-PCR approach capable to quantify each 5'TD and full-length (CVB-FL) viral populations at different DPI in hearts (Fig. 1c, d). Two populations of CVB-TD forms were characterized: one deleted from 8 to 36 nucleotides (nt) and one deleted from 37 to 50nt. These CVB-TD populations, dominant after 48 HPI ($p<0.009$), were initially associated with CVB-FL which became undetectable after 14 DPI (Fig. 1c, d). Our results evidenced early emergence of major CVB-TD populations during acute myocarditis without any detectable CVB-FL forms after 14 DPI.

To evaluate innate immune response after CVB3/28 infection in mice, cytokine levels (MCP-1, IL-10, TNF-α, IFN-β) were quantified in homogenized mouse heart tissues. As shown in Fig. 1e, in comparison with other pro-inflammatory cytokines, IFN-β protein levels rapidly drops at 3 DPI after a slight increase at 2 DPI. Interestingly, IFN-β protein levels appeared to be negatively correlated with proportions of 8-50nt CVB-TD forms detected between 2 and 7 DPI ($R^2=0.52$, $p=0.002$), but not with other cytokines (Fig. 1f and Sup Fig 1). These findings suggest

that CVB-TD forms proportions can down regulate IFN-β pathway activation in mice during the early stage of CVB3-induced myocarditis.

To further explore the relationship between cardiac IFN-β response and CVB-TD emergence, we compared the IFN-β response induced by CVB3/28, Poly(I:C) (150µg/mouse) and a mouse cardiotropic virus (Mengovirus). We used two Mengovirus strains that are known for impairing (WT) and inducing (Zn) IFN-β production levels in brain and blood of various mouse models[23]. We evidenced a peak of IFN-β mRNA fold-change and protein secretion at 24 and 48 HPI respectively in cardiac tissues of CVB3/28-infected mice and a significant decrease after 48 and 72 HPI ($p=0.029$) (Sup Fig 2). A sustained increase in IFN-β mRNA fold-change and protein levels were observed in Mengovirus Zn and Poly(I:C)-inoculated mice after 8 HPI in comparison with CVB3/28-infected mice ($p<0.029$) (Sup Fig 2). As expected, Mengovirus WT-infected mice did not experience an increase in IFN-β mRNA fold-change nor protein secretion (Sup Fig 2)[23]. Conversely, CVB-TD/FL ratio experienced a significant increase between 24 and after 48 HPI ($p<0.024$) (Fig. 1g). Remarkably, IFN-β mRNA fold-changes were negatively correlated with CVB-TD/FL ratio from 8 to 72 HPI ($R^2=0.45$; $p=0.004$) (Fig. 1h) indicating that CVB-TD RNA forms proportions significantly down regulate IFN-β transcription levels in mouse cardiac tissues during the early phase of acute myocarditis.

Inoculation of cardiac CVB-TD populations in mice induces myocarditis again and modulates IFN-β signaling

To assess CVB-TD populations' ability to infect cardiac cells *in vivo*, we inoculated DBA/2J mice with homogenized-hearts collected from previously 3 (15% of CVB-FL; 26% of CVB-TD 8-36nt; 59% of CVB-TD 37-50nt), 14 (23.5% of CVB-TD 8-36nt; 76.5% of CVB-TD 37-50nt) or 28 (17% of CVB-TD 8-36nt and 83% of CVB-TD 37-50nt) DPI CVB3-infected mice

(Fig 2a). Following an infection running from 24 to 72 hours, we showed that cardiac CVB-TD populations from 3 14 and 28 DPI-infected mice have reached the heart and demonstrated stable replication activities (Fig. 2b). Despite the absence of infectious particle in 14 and 28 DPI homogenized-hearts supernatants, their intra-peritoneal inoculation induced sparse inflammatory foci and VP1 detection in cardiac cells (Fig. 2c-e; Sup Fig 3). Inoculated CVB-TD populations remained detectable at 72 hours post infection (Fig. 2d). Mice inoculated with 3-DPI homogenized-hearts experienced a significant increase in IFN-β mRNA and protein levels, similar to those of CVB3-infected mice at 24 and 48 hours post infection (Fig. 2f, g). Interestingly, mice inoculated with 14-DPI homogenized-hearts experienced a significant increase in IFN-β mRNA levels at 48 HPI (Fig. 2g). IFN-β production was not or less increased in mice infected with 14 and 28-DPI homogenized hearts, in comparison with those infected with CVB3/28 or 3-DPI homogenized hearts. Together, these results show that emerging cardiac CVB-TD populations can infect and replicate in cardiac tissues alone in vivo, and can modulate IFN-β production and induce again myocarditis.

In vivo transfection of CVB-TD50 RNA forms induces focal myocarditis without IFN-β increase

To better understand the direct link between CVB-TD and IFN-β modulation, we performed *in vivo* transfection assay of CVB-FL and 5'TD viral RNA forms (Sup Fig. 4). Using Jet-PEI reagent in vivo, by intravenous route, we show that all synthetic RNA forms are detectable in the heart 8 hours after transfection with similar replication activities levels (Fig. 3a). We show that CVB-FL RNA forms transfection induced an IFN-β increase in the heart ($p=0.008$; Fig. 3b). By contrast, CVB-TD50 RNA forms transfection did not induce any increase in IFN-β level compared to CVB-FL transfected-mice ($p=0.008$; Fig. 3b). All transfected RNA forms induced inflammatory foci in the heart at 7 DPI (Fig. 3c). Moreover, viral translation activity

was assessed by VP1 immunohistochemistry (Fig 3c). CVB-FL and TD RNA forms transfection resulted in viral protein production in cardiac cells 7 days after transfection. These results demonstrate that CVB-TD50 RNA forms transfection induce myocarditis without an IFN-β signaling response increase, whereas CVB-FL RNA forms transfection increased IFN-β production levels.

Impact of CVB-FL and CVB-TD forms transfection on IFN-β pathway activation in human cardiomyocytes

Since 50nt CVB-TD forms were associated with a down regulation of IFN-β response in mice's hearts, a key biological issue was to identify 5'UTR secondary-structural elements able to modulate innate immune response (Fig. 4a). IFN-β cytokine level was quantified in the supernatant of previously transfected HCM, revealing an increase in IFN-β concentration after CVB-FL transfection but not with CVB-TD50 ($p<0.01$; Fig. 4b). Transfection of synthetic CVB-FL and 8-36nt CVB-TD forms induced significantly higher levels of IFN-β mRNA than transfection of 50-100nt CVB-TD forms into HCM ($p<0.01$), whereas no difference was found between 8 to 36nt CVB-TD forms (Fig. 4c). Results were similar for levels of ISG56 mRNA, with significantly higher amount produced after CVB-FL forms transfection than with CVB-TD forms (Fig. 4d). Secondary-structural elements of the 5'UTR are depicted in figure 5c indicating that stem-loop "c" and stem-loop "d" were located between 36 and 80nt. Loss of these two secondary-structure elements could explain the low capacity of 50nt and 100nt CVB-TD forms to increase IFN-β mRNA and cytokine production. These results indicate that stem loops "c" or "d" of the viral RNA domain I are essential CVB genomic structures responsible for IFN-β signaling pathway induction in human cardiac cells.

Poly(I:C)-induced IFN-β production decreases 5'terminally deleted CVB RNA replication in the heart of CVB3/28-infected mice

Since 5'TD CVB3 RNA forms proportions can down regulate IFN-β signaling pathway activation in our mouse myocarditis model, we postulated that the *in vivo* induction of high IFN-β production levels could significantly decrease 5'TD CVB3 RNA forms loads in hearts of CVB3/28-infected mice. In order to explore this hypothesis, we induced a strong type I IFN response with an unspecific agonist of TLR3 (Toll-like-receptors) and RLR (RIG-I-like-receptors) (150µg of Poly(I:C) HMW) for two consecutive days after a CVB3/28 intraperitoneal infection (1 and 2 DPI). Poly(I:C)-treated mice experienced a significant reduction in fatality rates (Log-Rank test; $p=0.004$) and body-weight-loss in comparison with untreated mice (Tukey's multiple comparisons test; $p<0.014$) (Fig. 5a). In CVB3/28 infected mice, cardiac inflammation and necrosis levels were significantly lower in the Poly(I:C)-treated than in the untreated group ($p=0.016$) (Fig. 5b and Sup Fig 5). IFN-β mRNA and protein levels in the heart were increased in treated mice in comparison with untreated mice, after 2 or 3 DPI respectively ($p<0.029$) (Fig. 5c-d). Poly(I:C) treatment decreased viral RNA loads and PFU titers in the hearts from 2 to 14 DPI ($p=0.029$) (Fig. 5e-f). In Poly(I:C)-treated mice, 8-36nt and 37-50nt 5'TD CVB3 RNA load levels significantly decreased at 2, 3, 7 and 14 DPI comparatively to untreated mice ($p<0.025$) (Fig. 5g). Overall, these results show that the type 1 IFN signaling pathway activation is crucial for an efficient innate immune response, resulting in a viral clearance of CVB-TD populations, which can protect DBA/2J mice against myocarditis.

207 **Discussion**

208 Major enterovirus B (EV-B) populations characterized by 5'terminal genomic RNA deletions
209 (5'TD) ranging up to 50 nucleotides (EVB-TD) have been associated with the development of
210 myocarditis in mice and humans.[2–4] Type I interferon (IFN) signaling is known to be critical
211 for an efficient innate immune response against EV-B in mouse and human myocarditis.[15,18,24]
212 In the present study, we evidenced a sustained early emergence of major CVB3 5'TD (CVB-
213 TD) populations whose high proportions can down regulate type I IFN response in the heart of
214 DBA/2J mice with CVB3/28-induced myocarditis. To confirm immunomodulatory effects of
215 natural 5'terminal deletions in RNA domain I sequences, we inoculated the selected viral
216 populations in naive DBA/2J mice, then various synthetic CVB-TD RNA were generated *in*
217 *vitro* and transfected in mouse and in cultured human primary cardiomyocytes (HCM). Overall,
218 our experimental findings demonstrated how natural deletions within the 5'UTR affecting the
219 secondary-structural elements of the genomic RNA domain I (cloverleaf structure) modulate
220 type I IFN signaling pathway in cardiomyocytes during an experimental CVB3-induced
221 myocarditis.

222

223 We investigated dynamics of emergence of CVB-TD and full-length (CVB-FL) populations in
224 mice hearts. RNA-dependent RNA polymerase errors and lack of proofreading are likely to
225 explain early generation of CVB-TD forms in target cells (Fig. 1c-d)[25]. In the heart of CVB3-
226 infected mice, emerging CVB-TD populations became major after 24 hours of infection (HPI),
227 in comparison with CVB-FL forms, the minority population thereafter (Fig. 1c). These results
228 suggested an evolutionary advantage of CVB-TD forms in specific host cell conditions. The
229 37-50nt 5'terminal deletions could reduce the binding of specific replication factors to negative-
230 strand RNA[26,27]. Loss of such RNA binding might contribute to the significant reduction of
231 positive-strand RNA synthesis and aberrant low **(+)/(-)**RNA ratios found in CVB3-infected

mouse hearts (Sup Table 1)[27,28]. Consequently, hijacking of viral or cellular host factors of RNP complexes by major levels of CVB-TD forms could significantly impair genomic replication activities of minor CVB-FL forms explaining why they are undetectable from 14 to 28 DPI in the heart (Fig. 1c-d). Overall, our results suggest that specific host-cell conditions are necessary for emergence and maintenance of CVB-TD populations in mouse hearts[11,27,29].

In the present report, we identified cardiac early-emerging CVB-TD populations associated with CVB-FL forms, characterized by significant viral genomic replication activities resulting in high production levels of viral ssRNA and dsRNA (Fig 1 and Sup Table 1). These viral RNA are known to be recognized by innate immune sensors such as RIG-I-like-receptors (RLR) resulting in IFN-β signaling pathway activation[14,21]. Despite high levels of these replicative viral RNA forms, no strong nor sustained IFN-β pathway activation was observed, revealing a potential immunomodulatory effect of these CVB-TD populations (Fig. 1e-g). In comparison, Mengovirus Zn infection induced a strong IFN-β response activation in DBA/2J, demonstrating their ability to produce IFN-β locally in the heart (Sup Fig 2). Moreover, others inflammatory cytokines levels were increased during CVB3/28 infection, without correlation with CVB-TD viral loads (Sup Fig 1).

In order to understand the link between RNA domain I structures and IFN-β signaling pathway induction, we investigated the direct impact of CVB-TD and CVB-FL populations mix *in vivo*. Inoculation of homogenized mouse hearts from 14 and 28 DPI in mice revealed that CVB-TD populations without CVB-FL forms replicate in hearts and induce myocarditis without an IFN-β production increase (Fig. 2). Moreover, replicative 8-36nt CVB-TD forms remained detectable in hearts long after the infection and could be persistent forms (Fig. 2). We then explored how these low-level replicating RNA forms could escape the immune sensors and induce a persistent infection.

Using a strategy based on the transfection of synthetic CVB3/28 RNA mimicking mouse

emerging 5'terminal deletions into mouse and human cardiac cells, we studied the direct impact of CVB-FL and TD RNA forms on IFN-β signaling pathway and myocarditis (Fig. 3 and 4). Remarkably, *in vivo* transfection of CVB-TD50 and FL forms revealed that TD50 RNA forms alone induce inflammatory foci, without IFN-β increase in the heart (Fig 3). This result demonstrates the direct cardiac pathogenicity of CVB-TD50 forms, and their ability to escape innate immune clearance in immunocompetent mouse. In human cardiac cells, we identified stem-loops "c" or "d" of the viral RNA domain 1 (cloverleaf) as essential viral genomic structures responsible for IFN-β pathway induction including antiviral genes such as ISG56 (Fig 4). To date, whether the RLR recognition is dependent of RNA sequences or secondary structures remains unknown. We aim to further determine the major intra cytoplasmic innate immune sensor (RIG-I or MDA5) responsible for CVB 5'UTR detection using overexpressing and knock-out HEK293T cells for each RLR and to identify viral sequences and RNA secondary-structures that specifically interact with RIG-I or MDA5.

Because we demonstrated that CVB-TD emerging forms negatively modulate IFN-β signaling pathway activation, we examined the impact of Poly(I:C), an unspecific agonist of TLR3 (Toll-like-receptors) and RLR, on CVB3/28-induced myocarditis in DBA/2J mice (Fig 5). We showed that IFN-β signaling pathway activation at the onset of CVB3/28 infection decreased viral replication and translation levels, and the cardiac cells necrosis (Fig 5). IFN-β levels in the heart of infected and treated mice were elevated, in comparison with non-treated mice, with a significant increase in overall survival (Fig 5). This result highlights the potential therapeutic benefit of immunotherapies in acute and chronic myocarditis.

Altogether, these results indicate that modulation of IFN-β by emerging CVB-TD forms could be a key step to achieve long-lasting viral genome maintenance in cardiomyocytes, driving the development of CVB3 acute and persistent cardiac infections. IFN-β signaling is known to directly impair picornavirus replication by inducing RNAse L and 2-5(A) synthetase

expression[15]. The 2-5(A) synthetase/RNAse L pathway, exhibiting ribonuclease activity on double-strand RNA, has been shown to be the major mechanism used by IFN-β to inhibit the replication of picornaviruses[15]. Viral populations with 5'terminal deletions in RNA domain-I disrupting secondary RNA structures could avoid immune restriction by low IFN-β secretion and ISG transcription levels. Modulation of RLR activation by loss of 5'terminal RNA structures of CVB-TD could impair IFN-β pathway activation, thus regulating IFN-β and ISG transcription and translation levels in infected cells. This mechanism could be a potential way to overcome antiviral immune host response and to lead to the development of sub-acute (14 DPI) and persistent (28 DPI) cardiac infection.

In conclusion, our results demonstrate an early emergence of CVB-TD populations during mouse myocarditis which down regulate IFN-β pathway activation in mouse and human cardiomyocytes. Moreover, our data reveal that natural deletions affecting secondary–structures of 5'terminal CVB3 RNA domain I can impair innate immune sensing mechanisms in cardiomyocytes during early phase of acute myocarditis. Deciphering the molecular mechanisms leading to the early emergence of CVB-TD will enable the development of target immunotherapies to restore an efficient antiviral innate immune response and potentially to achieve a viral clearance in acute and chronic EV-B-induced myocarditis.

299 ## Methods

300 **Cells, virus strain and reagents**

301 Hela cells were grown in minimum essential media (MEM) supplemented by 5ml Penicillin-
302 streptomycin (PS) (Gibco®, France), 5ml L-Glutamine and 10% Fetal Bovin serum (FBS)
303 (ThermoFisher®, France). Human primary CardioMyocytes (HCM, ScienCell Research
304 Laboratories®) were cultured in cardiac myocyte medium supplemented with 5% FBS
305 (ScienCell Research Laboratories®) at 37°C with 5% CO_2. Cardiac myocyte cell cultures were
306 passaged twice a week and the cells were harvested between passages 3 to 9. CVB3/28 virus
307 strain was gift from Steve Tracy (University of Nebraska Nincoln, USA)[30]. Mengovirus WT
308 and Zn strains were gift from Frank Van Kuppeveld (University of Utretch, Netherlands)[23].

309 **Virus production and titration**

310 HeLa229 cells were seeded at $0.8x10^6$ cells per well of tissue culture platelet (6 wells) and then
311 incubated at 37°C overnight. The next day, cell confluence was evaluated at $1,5x10^6$ cells per
312 well, based on previous experience, cells were then infected with CVB3/28 at a multiplicity of
313 infection (MOI) of 10^{-3} in free-serum MEM. After 48 hours post-infection, the supernatant was
314 collected and then clarified using low-speed centrifugation, virus particles were then measured
315 by plaque-forming-unit assay (PFU). Briefly, HeLa229 cells were infected with CVB3/28,
316 making serial dilutions, for 1h at 37°C. After viral adsorption, the inoculum was harvested, and
317 cells were overlaid with medium containing 2% agarose and incubated at 37°C. After 3 days,
318 viral plaques were visualized using bromophenol blue staining. The viral titers were expressed
319 as plaque forming unit per 1 ml (PFU/mL). The deleted 5' UTR viral sequences were obtained
320 as described previously[7].

321

322 **Ethic statement**

323 Experiments were performed according to recommendations of the "National Commission of
324 Animal Experiment (CNEA)" and the "National Committee on the Ethic Reflexion of Animal
325 Experiments (CNREEA)". The protocol was approved by the committee of animal experiments
326 of the Reims Champagne-Ardenne (accreditation number 56) and then by Ministry of Advanced
327 Education and research (permits number #37033-2022042914505068). All efforts were made
328 to minimize suffering in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals
329 of the Direction des Services Vétérinaires, the French regulations to which our animal care and
330 protocol adhered.

331 **Infection and transfection of mice**

332 Five-week-old male DBA/2J mice, purchased from Charles River laboratory® (France), housed
333 under pathogen free condition, were inoculated intraperitoneally with 10^6 PFU/mice
334 (CVB3/28), 10^4 PFU/mice (Mengovirus wild-type or Zn strain) and/or 150µg of Poly(I:C)
335 HMW in 150µl of saline; uninfected mice were inoculated with 150µl of saline. To determine
336 survival rates upon infection, loss of body weight was monitored daily for 28 days post-
337 infection and mice were euthanized if they had $\geq$ 20% loss of their initial body weight,
338 according to our protocol. Then mice were anesthetized with Ketamine/Xylazin (42.5/5 mg/kg)
339 and euthanized by cervical dislocation before organs collection at various pre-fixed times points
340 post-infection (8, 16, 24, 48 and 72 hours post infection, HPI; 7, 14, 28 and 42 days post-
341 infection, DPI). Infected or uninfected mice were sacrificed at the indicated times, a complete
342 autopsy was performed, and hearts were taken and fixed in formaldehyde 4% for histology or
343 homogenized in 600µl of PBS solution with TissueLyser LT (QIAGEN®, France). For Figure
344 3, DBA/2J mice were inoculated intraperitoneally with homogenized hearts collected at 3, 14
345 or 28 DPI from CVB3-infected mice. *In vivo* transfection was performed by intravenous route
346 using In Vivo-jetPEI® reagent (Polyplus Transfection, New York, USA) and mice were

sacrificed at indicated times post transfection. The transfection mixture consisted of 100 µg of synthetic viral RNA and 5 µl of In Vivo-jetPEI® in 5% Glucose solution.

Histology and immunohistochemistry

Hearts were sliced into three transverse biventricular sections as recommended for the diagnosis of myocarditis.[31] For each sample, four-µm-thick paraffin sections were cut at 3 levels. The slides were stained with Hematoxylin, Eosin and Safran (HES). The slides were examined by a pathologist for cellular infiltration, fibrosis, and necrosis. The lesions were graded using a scale of 0 (no necrosis, inflammation, or fibrosis), 1 (1 or 2 foci by slice), 2 (1 or 2 foci on every slice) to 3 (more than 2 foci on every slice). In addition, immunostaining was performed for CD3 (1/1000; Dako A0452), CD68 (1/100; Dako, M0814) and VP1 (1/1000; Dako, 5D8/1) as previously described[22,32].

Total RNA isolation and qRT-PCR

The homogenized cardiac tissues were subjected to digestion with proteinase K (Merck®). Total RNA was isolated with TRIzol RNA Isolation Reagents® (ThermoFisher®, France) method according to the manufacturer's instructions. RNA were stored at -80°C. Viral RNA copy number was quantified by RT–quantitative PCR with a StepOne plus realtime PCR system (ThermoFisher Scientific®) as described previously, using primers amplifying the CVB3/28: sense (5'-CAC ACT CCG ATC AAC AGT CA-3'), antisense (5'-GAA CGC TTT CTC CTT CAA CC-3') and probe FAM/TAMRA (5'-CGT GGC ACA CCA GCC ATG TTT-3') (Eurogentec®)[33].

Cytokines quantification

The hearts' supernatants were used for: 1) measurement of cytokines by Enzyme-Linked Immunosorbent assay (R&D Systems®, France) or ELISA kit for mouse IFN-β (MyBioSource®, USA); 2) virus particles determination as described above. Viral titers were expressed as plaque forming unit per 1 mg of total protein (PFU/mg). Measurement of total protein concentration in each supernatant was performed by the Bicinchoninate Acid Method (Sigma Aldrich®, France) according to the manufacturer's instructions. Cytokine protein level was expressed as pg or ng/mg of total protein by calculating the ratio cytokine concentration/total protein concentration. For the quantitative determination of human IFN-β concentrations in cell culture supernatants, ELISA assays using commercially available VeriKine Human IFN Beta ELISA kits (R&D Systems®, France) were performed according to the manufacturer's instructions.

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

RNA was extracted from hearts lysates or cultured cells with TRIzol Reagent® (Invitrogen, Life Technologies) and reverse transcribed using SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen Life Technologies®) following to the manufacturer's instructions. cDNA was subjected to PCR using PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific®) to detect IFN-β and ISG56 expression. The primers used for PCR detection as follows: for human IFN-β, forward primer 5'-AGCTGAAGCAGTTCCAGAAG-3' and reverse primer 5'-AGTCTCATTCCAGCCAGTGC-3'; human ISG56, forward primer 5'-TCCCCTAAGGCAGGCTGTC-3' and reverse primer 5'-GACATGTTGGCTAGAGCTTCTTC-3'; mouse IFN-β, forward primer 5'-GCCTTTGCCATCCAAGAGATGC-3' and reverse primer 5'-ACACTGTCTGCTGGTGGAGTTC-3'. Primers specific to human glyceraldehyde-3-

393 phosphate dehydrogenase (GAPDH) (forward primer 5'AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3'
394 and reverse primer 5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3') and mouse GAPDH (forward
395 primer 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3' and reverse primer 5'-
396 ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3') were used as the internal control. PCR was carried
397 out in StepOnePlus Real-Time PCR Systems (ThermoFisher Scientific®) programmed as
398 follows: denaturation step at 94°C for 15s, annealing step at 63°C for 10s, and extension step
399 at 72°C for 15s (40 cycles) for human primers or denaturation step at 95°C for 15s,
400 annealing/extension step at 65°C for 1min (40 cycles) for mouse primers, before melting curve.
401 Results were analyzed with ΔΔCT method, where CT is threshold cycle, and normalized to
402 GAPDH mRNA. Data are represented as levels of mRNA relative to that of the mock
403 transfected control samples and are displayed as the means ± SD of results from at least three
404 independent *in vitro* experiments.

405 **Rapid amplification of cDNA ends-PCR (RACE-PCR)**

406 Viral RNA (200ng) was reverse transcribed using Superscript II kit (Invitrogen,
407 ThermoFisher®) with 400nM AvCRev[6]. The 5'extremity of cDNA was then ligated with a T4
408 DNA Ligase (Ambion, ThermoFisher®) and was incubated 24 hours at 16°C. Positive cDNA
409 was amplified by a classical PCR reaction and amplicons were then sized and quantified by
410 Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analyses (Agilent®) as previously described[7]. Viral
411 populations deleted from less than 8 nucleotides were considered as full-length viral
412 populations.

413 **Positive and negative-strand RNA ratio**

414 Negative-strand RNA was isolated from total RNA by annealing a biotinylated negative-strand
415 specific primer and binding to streptavidin-labeled magnetic beads (Invitrogen®, Life
416 Technologies, Saint-Aubin, France) and was quantified by RT-qPCR as previously described[33].

417 The positive to negative strand viral RNA ratio was then determined using the following
418 calculation: (total EV RNA – negative strand EV RNA)/negative strand EV RNA[33].

419 **Single and double-strand RNA ratio**

420 Double-strand EV-B RNA was isolated by digesting single-strand RNA with recombinant
421 bacterial RNase A (ThermoScientific®)[34]. A mix of 200ng of total RNA with 1µl of RNase and
422 buffer solution of NaCl at 0.3M, were incubated 10min at 25°C. Double-strand viral RNA copy
423 number was quantified with a One-Step real-time RT-PCR assay using serial dilutions of the
424 transcripts for the generation of the standard curves. The single-strand to double-strand viral
425 RNA ratio was then determined using the calculation: (total EV RNA – double-strand EV
426 RNA)/double-strand EV RNA.

427 **Replication capacities, progeny and encapsidation assessment**

428 Hela cells were seeded at $1{,}5x10^5$ cells per well of tissue culture platelet (24 wells) and then
429 incubated at 37°C overnight. The next day, cell confluence was evaluated, based on previous
430 experience, and cells were infected with 300µl of homogenized heart supernatants, for 1h at
431 37°C. Encapsidation of these viral RNA forms was assessed by challenging viral entry capacity
432 with or without proteinase K treatment (Merck®) which digest all proteins, including viral
433 proteins in the sample[35]. After viral adsorption, the inoculum was collected, and cells were
434 overlaid with free-serum MEM and incubated at 37°C. After 72 hours, supernatant and cells
435 were harvested separately. Viral loads and titers were measured as described above or in
436 detailed methods.

437 **Transfection of human cardiomyocytes**

438 Transfection were carried out as described previously[7]. HCM were transfected with various mix
439 of synthetic 8, 36, 50nt deleted and/or full-length EV-B RNA mimicking proportions

(respectively 20%, 20%, 80% and 20%) found in mice's hearts during acute myocarditis. Plates were incubated at 37°C for 8 hours (IFN-β and ISG56) or 24 hours (viral loads).

In vitro dephosphorylation assays

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

Statistical analysis

Mann-whitney's test was used for organs viral data, *in vitro* viral data and ELISA results and Kaplan-Meier test to assess the statistical analysis for survival rates. Spearman correlation test was performed. The observed differences were considered significant when P values < 0.05. The number (n) of animal used in the experiment is specified in figure legend. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 (Prism®).

Acknowledgments

We thank the animal facility department of the Faculty of Pharmacy and Medicine (URCA, Reims).

Sources of Funding

This work was supported by a grant from the "Fédération Française de Cardiologie" (FFC grant 2019 "Etude CardioVir") and by a local research grant for emerging research teams from the University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Disclosures

None

References

1. Baggen, J., Thibaut, H. J., Strating, J. R. P. M. & van Kuppeveld, F. J. M. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 368–381 (2018).
2. Genoni, A. *et al.* Revealing enterovirus infection in chronic human disorders: An integrated diagnostic approach. *Sci. Rep.* **7**, 5013 (2017).
3. Tracy, S., Smithee, S., Alhazmi, A. & Chapman, N. Coxsackievirus can persist in murine pancreas by deletion of 5′ terminal genomic sequences: Coxsackievirus Persistence in the Pancreas. *J. Med. Virol.* **87**, 240–247 (2015).
4. Tam, P. E., Fontana, D. R. & Messner, R. P. Coxsackievirus B1–induced chronic inflammatory myopathy: differences in induction of autoantibodies to muscle and nuclear antigens by cloned myopathic and amyopathic viruses. *J. Lab. Clin. Med.* **142**, 196–204 (2003).
5. 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).
6. Bouin, A. *et al.* Major Persistent 5′ Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in Human Endomyocardial Tissues. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1488–1490 (2016).
7. Glenet, M. *et al.* Major 5′terminally deleted enterovirus populations modulate type I IFN response in acute myocarditis patients and in human cultured cardiomyocytes. *Sci. Rep.* **10**, 11947 (2020).
8. 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).

9. 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).
10. Callon, D. *et al.* Early Emergence of 5′ Terminally Deleted Coxsackievirus-B3 RNA Forms Is Associated with Acute and Persistent Infections in Mouse Target Tissues. *Vaccines* **10**, 1203 (2022).
11. Lévêque, N. *et al.* Functional Consequences of RNA 5′-Terminal Deletions on Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *J. Virol.* **91**, (2017).
12. Glenet, M. *et al.* Structures and Functions of Viral 5′ Non-Coding Genomic RNA Domain-I in Group-B Enterovirus Infections. *Viruses* **12**, 919 (2020).
13. Feng, Q. *et al.* MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep.* **2**, 1187–1196 (2012).
14. Feng, Q. *et al.* Coxsackievirus Cloverleaf RNA Containing a 5′ Triphosphate Triggers an Antiviral Response via RIG-I Activation. *PLoS ONE* **9**, e95927 (2014).
15. Wessely Rainer, Klingel Karin, Knowlton Kirk U., & Kandolf Reinhard. Cardioselective Infection With Coxsackievirus B3 Requires Intact Type I Interferon Signaling. *Circulation* **103**, 756–761 (2001).
16. Knowlton Kirk U. Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* **139**, 2339–2341 (2019).
17. Rose, N. R. Critical Cytokine Pathways to Cardiac Inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.* **31**, 705–710 (2011).
18. Deonarain Raj, Cerullo Dante, Fuse Koichi, Liu Peter P., & Fish Eleanor N. Protective Role for Interferon-β in Coxsackievirus B3 Infection. *Circulation* **110**, 3540–3543 (2004).

511 19. Lassner, D. *et al.* CCR5del32 genotype in human enteroviral cardiomyopathy leads to
512 spontaneous virus clearance and improved outcome compared to wildtype CCR5. *J. Transl.*
513 *Med.* **16**, (2018).
514 20. Antoniak, S. *et al.* PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection.
515 *J. Clin. Invest.* **123**, 1310–1322 (2013).
516 21. Reikine, S., Nguyen, J. B. & Modis, Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of
517 RIG-I and MDA5. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
518 22. Andréoletti, L. *et al.* Experimental CVB3-induced chronic myocarditis in two murine
519 strains: evidence of interrelationships between virus replication and myocardial damage in
520 persistent cardiac infection. *J. Med. Virol.* **52**, 206–214 (1997).
521 23. Hato, S. V. *et al.* The mengovirus leader protein blocks interferon-α/β gene transcription
522 and inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *Cell. Microbiol.* **9**, 2921–2930
523 (2007).
524 24. Liu, H., Li, M., Song, Y. & Xu, W. TRIM21 Restricts Coxsackievirus B3 Replication,
525 Cardiac and Pancreatic Injury via Interacting With MAVS and Positively Regulating IRF3-
526 Mediated Type-I Interferon Production. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
527 25. Peersen, O. B. Picornaviral polymerase structure, function, and fidelity modulation. *Virus*
528 *Res.* **234**, 4–20 (2017).
529 26. Ertel, K. J., Brunner, J. E. & Semler, B. L. Mechanistic Consequences of hnRNP C Binding
530 to Both RNA Termini of Poliovirus Negative-Strand RNA Intermediates. *J. Virol.* **84**,
531 4229–4242 (2010).
532 27. Brunner, J. E., Ertel, K. J., Rozovics, J. M. & Semler, B. L. Delayed kinetics of poliovirus
533 RNA synthesis in a human cell line with reduced levels of hnRNP C proteins. *Virology* **400**,
534 240–247 (2010).

28. 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).

29. Kamma, H., Portman, D. S. & Dreyfuss, G. Cell Type-Specific Expression of hnRNP Proteins. *Exp. Cell Res.* **221**, 187–196 (1995).

30. Tu, Z. *et al.* The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J. Virol.* **69**, 4607–4618 (1995).

31. 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 (2013).

32. N'Guyen, Y. *et al.* Enterovirus but not Parvovirus B19 is associated with idiopathic dilated cardiomyopathy and endomyocardial CD3, CD68, or HLA-DR expression. *J. Med. Virol.* **89**, 55–63 (2017).

33. 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**, 3378–3380 (2012).

34. Wang, P.-H. *et al.* RNase If -treated quantitative PCR for dsRNA quantitation of RNAi trait in genetically modified crops. *BMC Biotechnol.* **18**, (2018).

35. Roder, A. E. & Horner, S. M. Measuring Hepatitis C Virus Envelopment by Using a Proteinase K Protection Assay. in *Hepatitis C Virus Protocols* (ed. Law, M.) vol. 1911 209–217 (Springer New York, 2019).

Figures with figure captions

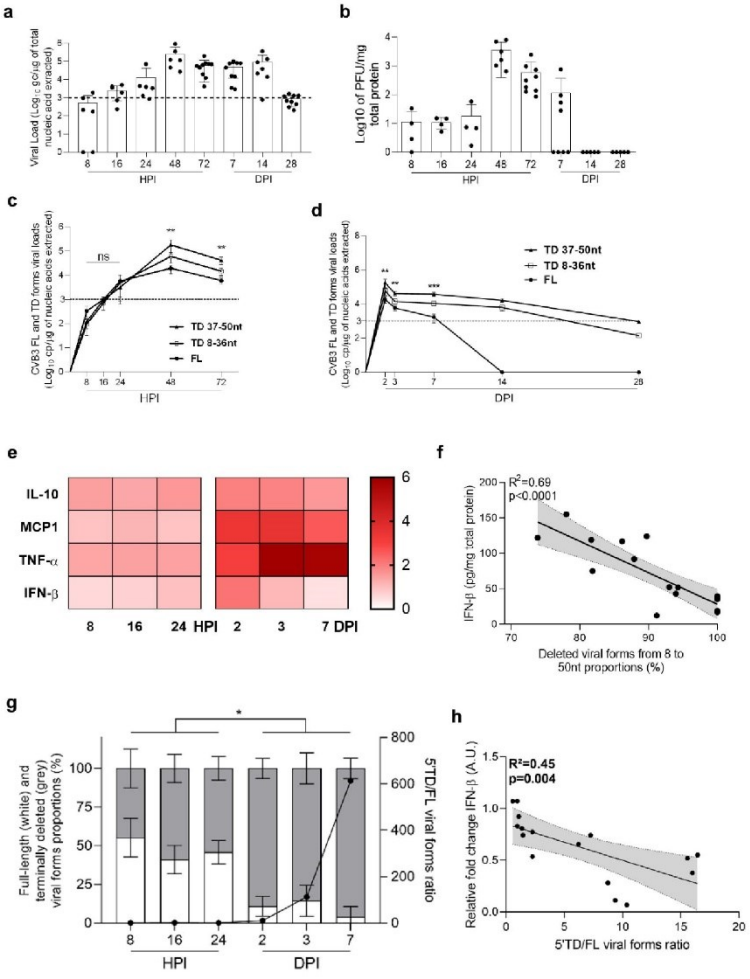
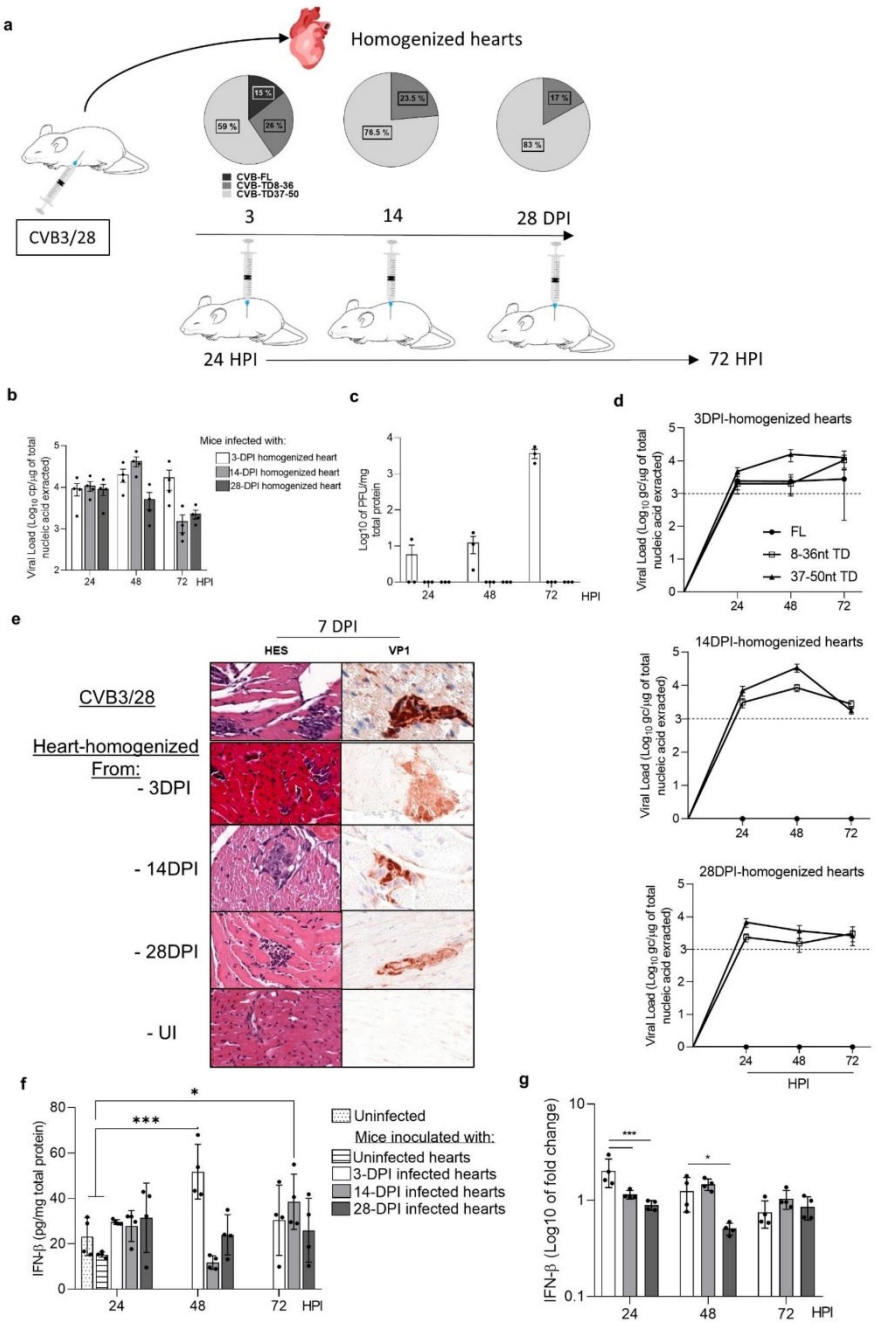


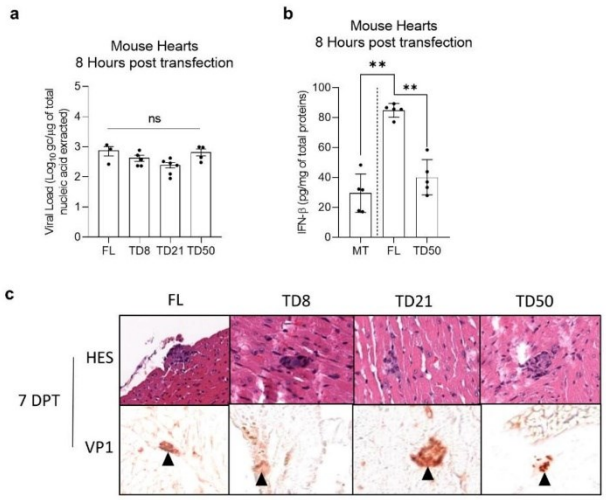
Figure 1. The emergence of 5'terminally deleted CVB populations is associated with a low type 1 interferon response in the heart. a Viral load levels (RT-qPCR) in the heart of infected mice at 8, 16, 24, 48 and 72 HPI, 7, 14 and 28 DPI (n=6 to 10). Dotted line represents the significance threshold of 10^3 gc/µg. **b** Viral titers (PFU) in the homogenized heart supernatants at 8, 16, 24, 48 and 72 HPI, 7, 14 and 28 DPI.(n=4 to 9). **c-d.** CVB-TD and FL respective viral

564 loads were assessed using a RACE-PCR method associated with a micro-electrophoresis at 8,
565 16, 24, 48 and 72 HPI, 7, 14 and 28 DPI (n=6 to 10). Data represent mean +/- SD. (Mann-
566 Whitney U test; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$). **e** Cytokines levels measured by ELISA (heatmap
567 view) in homogenized heart supernatants expressed as fold change relative to uninfected mice
568 data (n=6). **f** Linear regression curves and Spearman R coefficient of correlation between IFN-
569 β levels and the proportions of 8-50nt 5'TD viral populations (2-7 DPI, n=16). **g** Full-length
570 (white) and 5'terminally deleted (grey) viral forms proportions in hearts of CVB3/28 infected
571 mice from 8 HPI to 7 DPI with the 5'TD/FL ratio (line and dot). (Mann-Whitney U test between
572 5'TD/FL ratio; *: $p<0.05$). **h** Linear regression curves and Spearman R coefficient of correlation
573 between cardiac IFN-β mRNA fold-changes and the 5'TD/FL ratio (8 to 72 HPI; n=16).


a
Homogenized hearts
15 %
59 %
26 %
23.5 %
76.5 %
17 %
83 %
CVB-FL
CVB-TD8-36
CVB-TD37-50
CVB3/28
3
14
28 DPI
24 HPI
72 HPI
b
Viral Load (Log10 cp/µg of total nucleic acid extracted)
Mice infected with:
3-DPI homogenized heart
14-DPI homogenized heart
28-DPI homogenized heart
24
48
72
HPI
c
Log10 of PFU/mg total protein
d
3DPI-homogenized hearts
14DPI-homogenized hearts
28DPI-homogenized hearts
Viral Load (Log10 gc/µg of total nucleic acid extracted)
FL
8-36nt TD
37-50nt TD
e
7 DPI
HES
VP1
CVB3/28
Heart-homogenized From:
- 3DPI
- 14DPI
- 28DPI
- UI
f
IFN-β (pg/mg total protein)
*
***
Uninfected
Mice inoculated with:
Uninfected hearts
3-DPI infected hearts
14-DPI infected hearts
28-DPI infected hearts
g
IFN-β (Log10 of fold change)
***
*

574

Figure 2. Inoculation of cardiac CVB RNA populations in mice induces acute and chronic myocarditis again. a Schematic illustration of the experimentation. **b** Viral loads (RT-qPCR) in the hearts of mice infected with homogenized hearts or CVB3/28 (n=4). **c** Viral titers (PFU assay) in the hearts of mice infected with homogenized hearts or CVB3/28 (n=3). **d** 8-36nt and 37-50nt CVB-TD and FL respective viral loads in mice's hearts infected with homogenized hearts or CVB3/28, assessed using a RACE-PCR method associated with a micro-electrophoresis from 24 HPI to 43 DPI (n=4 to 8). **e** Histology (HES) and immunohistochemistry for viral protein 1 (VP1, orange-brown staining) of mouse hearts at 7 DPI. **f g** IFN-β mRNA and cytokine levels fold-changes (RT-qPCR and ELISA) in homogenized hearts supernatants of mice infected with homogenized hearts or CVB3/28 (n=4). Data represent mean +/- SD (Two-way ANOVA Multiple comparisons; *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; ****: $p<0.0001$ *versus* CVB3/28-infected mice or uninfected mice). Not specified: non-significant.

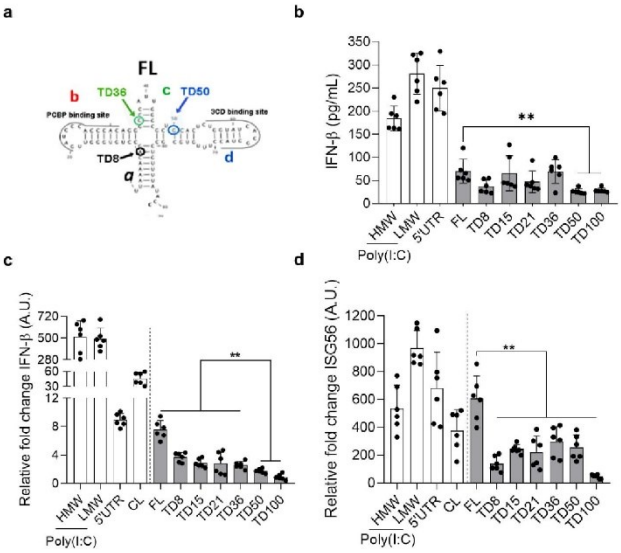


588

589 **Figure 3. CVB-TD50 transfection in DBA/2J mice induces acute myocarditis without IFN-**
590 **β increase. a**. Viral loads (RT-qPCR) in the hearts of mice transfected with CVB-FL, TD8,
591 TD21 or TD50 RNA forms, at 24 hours post transfection (n=3 to 4). **b.** IFN-β cytokine levels
592 (ELISA) in hearts of uninfected mice or mice transfected with CVB-FL or TD50 RNA forms,
593 at 24 hours post transfection. Data represent mean +/- SEM (n=5) **c** Histology (HES) and
594 immunohistochemistry for viral protein 1 (VP1, orange-brown staining, black arrows) of mouse
595 hearts at 7 DPI (n=2). MT: mock-transfected mice. DPT: days post-transfection.

596

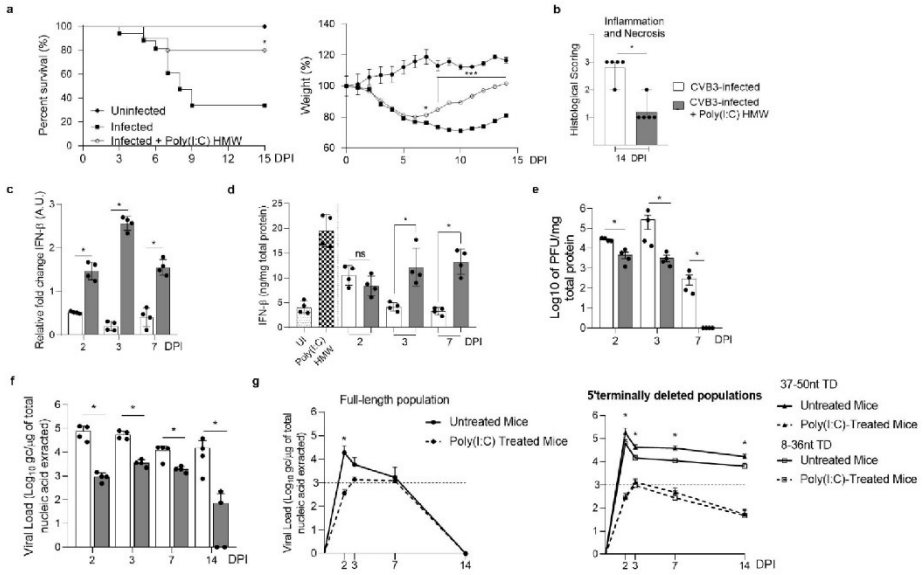
597



598

599 **Figure 4. Impact of CVB3 viral populations on IFN-β pathway activation in human**
600 **cardiomyocytes. a** Schematic representation of EVB cloverleaf secondary structures with stem
601 "a" and stem-loops "b", "c" and "d". Schematic representations of deletions of 8, 36 and 50nt
602 and its impact on cloverleaf secondary structures, loss of stem "a", stem "a" plus stem-loop "b"
603 and loss of stem "a" and stem-loops "b-c", respectively. **b** IFN-β cytokine levels (ELISA) in
604 supernatants of HCM at 8 hours' post-transfection of various CVB3 RNA forms Data represent
605 mean +/- SD (n=3). **c d** IFN-β and ISG56 semi-quantification (RT-qPCR) expressed as fold
606 change over mock transfected cells, at 8 hours post-transfection. Data represent mean +/- SD
607 (n=3) (Mann-Whitney U test; *: $p<0.05$; **: $p<0.01$ and n.s: non-significant).

608



609

610 **Figure 5. IFN-β signaling pathway stimulation by Poly(I:C) decreased 5'terminally**
611 **deleted CVB3 RNA forms viral loads, cardiac lesions and mortality in DBA/2J mice. a**
612 Survival curve and follow-up of body weight of CVB3/28-infected mice (n=17; black square)
613 compared to infected Poly(I:C) HMW-treated mice (n=10; white circle) and uninfected mice
614 (n=9; black circle) (*: $p<0.05$ by Log-Rank test between infected and infected-treated groups).
615 Data represent mean +/- SEM (*: $p<0.05$, ***: $p<0.001$, by Tukey's multiple comparison test
616 between infected and infected-treated groups). **b** Semi-quantification of inflammation and
617 necrosis in treated group (grey bar) and untreated group of mice (white bar) (n=5 each) at 14
618 DPI. Data represent mean +/- range**. c d** IFN-β mRNA fold-changes and ELISA of IFN-β in
619 homogenized heart supernatants of treated and untreated infected mice (n=4 each). **e f** Viral
620 titers (PFU assay) and loads (RT-qPCR) of treated infected mice versus untreated infected mice
621 (n=4). **g** CVB-TD and FL respective viral loads were assessed as previously described for

622 treated infected mice (n=3 each DPI), and compared with untreated infected mice (n=6 to 10).

623 Data represent mean +/- SD. (Mann-Whitney U test, *: $p<0.05$).

624

Supplementary material

Table

Table 1. Viral properties of detected CVB3 populations at 3, 14 and 28 DPI

		Heart		
	Days Post Infection	**3**	**14**	**28**
	(+)/(-) vRNA Ratio	59.8	5.0	4.8
	ss/ds vRNA Ratio	39.4	7.0	0.4
Viral cell-culture challenge (HeLa-229 cells, 72-h)	**Entry Capacity (%)**	68	24	48
	Proteinase K-treated Entry Capacity (%)	0	0	0
	Fold of normalized genome copy increase	587	2.5	12.1
	PFU (PFU/ml)	$3*10^7$	ND	ND

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

Figures

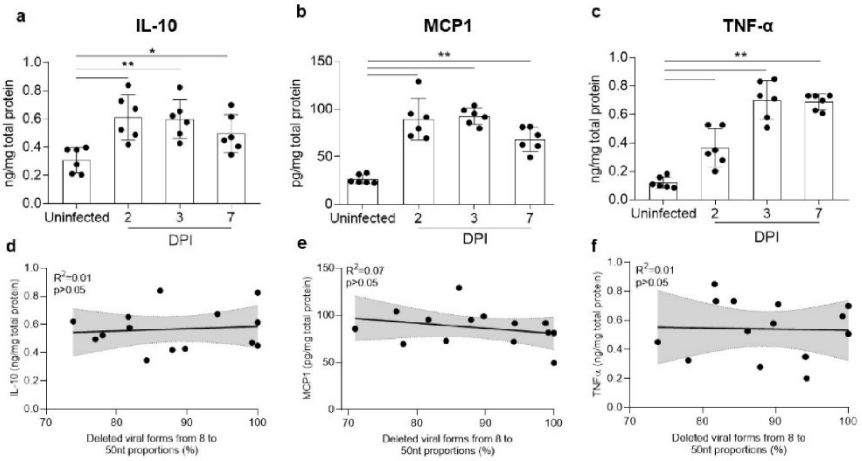


Figure 1. Pro-inflammatory response levels in the hearts of CVB3/28-infected DBA/2J mice. a b c Above, IL-10, MCP-1 and TNF-α levels were measured by ELISA in homogenized cardiac tissues supernatants of DBA/2J mice at acute phase of CVB3/28 infection and compared to cytokines levels in homogenized hearts supernatants of uninfected DBA/2J mice (n=6). **d e f** Below, linear regression curves and Spearman R coefficient of correlation between cytokines levels and the proportions of 8-50nt 5'TD viral populations (2-7 DPI, n=16). Data represent mean +/- SD (Mann-Whitney U test; *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; ****: $p<0.0001$). Ns or not specified: non-significant.

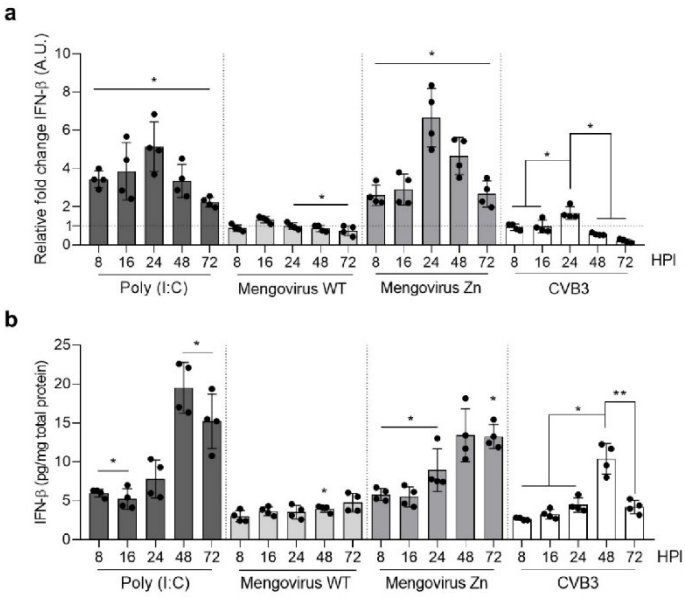


Figure 2: Interferon-β response in DBA/2J mice after Mengovirus wild-type or Zn, or CVB3/28 infection, or Poly(I:C) inoculation. a-b IFN-β mRNA fold-changes (RT-qPCR) (with heatmap view) and ELISA of IFN-β in homogenized hearts supernatants of mice following injection (Day 0) with Poly(I:C) HMW, Mengovirus WT, Mengovirus Zn and CVB3/28 (n=4 each). Data represent mean +/- SD (Mann-Whitney U test; *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; versus CVB3/28-infected mice). Not specified: non-significant.

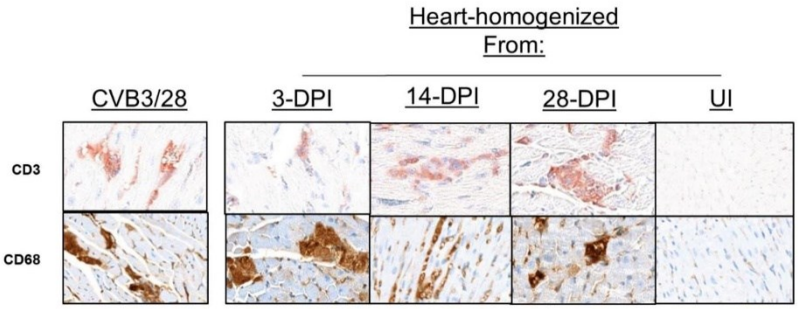


Figure 3: Inflammatory cells infiltrates in heart of DBA/2J mice, infected with CVB3/28 or inoculated with homogenized hearts from 3, 14, 28-DPI or uninfected mice. Immunohistochemistry for CD3 (brown staining) and CD68 (brown staining) cells (monoclonal antibodies) in the heart. Original magnification: x200.

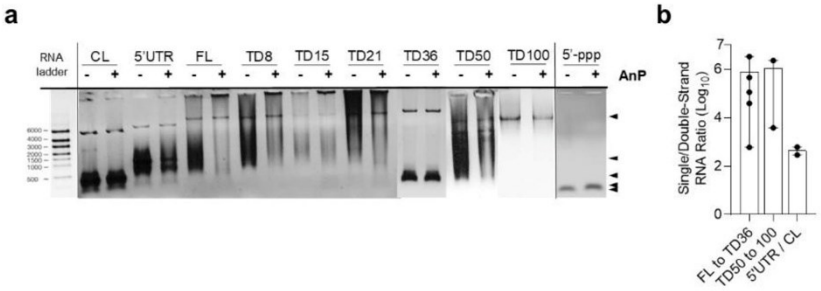


Figure 4: Properties of synthetic viral RNA. a Synthetic CVB3/28 RNA 5'TD and FL were treated or not by Antarctic Phosphatase (AnP). Results were visualized using 1% agarose gel electrophoresis. Arrows indicated the RNA band sizes on the gel picture. **b** Double-strand and single-strand RNA copy number ratio after RNase A digestion of CVB3/28 synthetic RNA. Data present mean +/- range.

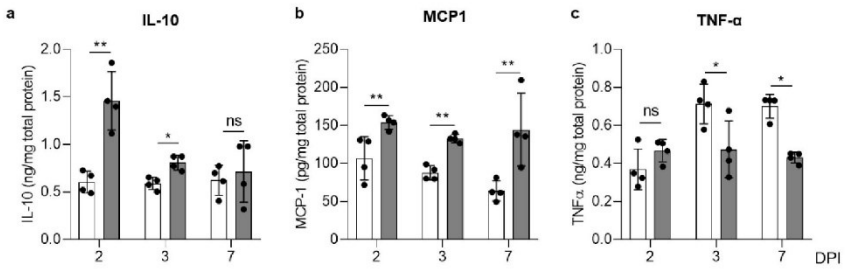


Figure 5: Poly(I:C) HMW treatment of CVB3/28-infected mice induces higher levels of IL-10 and MCP-1 but lower levels of TNF-α than in untreated CVB3/28-infected mice. a b c IL-10, MCP-1 and TNF-α levels were measured by ELISA in homogenized heart supernatants of mice during acute myocarditis (2 to 7DPI) with or without Poly(I:C) HMW treatment (150µg at 1 and 2 DPI) (n=4 each). Data represent mean +/- SD (Mann-Whitney U test; *: $p<0.05$; **: $p<0.01$). ns: non-significant.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Nos travaux ont montré l'émergence précoce et le maintien de populations majoritaires d'EV-B tronqués en région 5'NC pendant la phase aiguë de l'infection dans deux organes cibles : le cœur et le pancréas. Les proportions élevées de ces populations tronquées régulaient négativement la réponse IFN-1 dans le cœur. Dans le pancréas, le métabolisme insulinique était perturbé par le maintien des populations virales tronquées en région 5'NC. Ces formes virales émergeant précocement induisent des lésions cardiaques et pancréatiques, aigues puis chroniques, avec des modifications cellulaires structurales et métaboliques.

Des ARN synthétiques de CVB3 porteurs de délétions d'extension progressive en 5'terminale ont été générés *in vitro* et transfectés dans des cardiomyocytes humains (HCM) et dans cellules bêta pancréatiques de rongeur (INS-1-E1). Ces modèles cellulaires ont confirmé l'effet significatif de régulation négative des formes majoritaires d'EV-B tronqués de 37 à 50nt sur l'induction de la voie des IFN-β et l'impact sur le métabolisme insulinique. De plus, cette stratégie *in vitro* a permis d'identifier les tige-boucles "c" et/ou "d" du domaine I de l'ARN viral (feuille de trèfle) comme étant des structures génomiques virales essentielles dans l'induction de la voie des IFN-β, et des voies de signalisation en aval telles que celle des gènes stimulés par l'interféron (ISG56).

A. Emergence et distribution des populations virales

Au cours des infections virales, l'émergence de génomes viraux mutants a été décrite pour de nombreux virus, formant des quasi-espèces virales (111). Les populations d'EV-B tronqués en région 5'NC forment une quasi-espèce, ayant une « *fitness* » virale plus faible que les populations complètes dont elles sont issues (23,24). Ces quasi-espèces d'EV-B tronqués en région 5'NC sont majoritaires dans les cellules cibles de notre modèle murin avec des activités soutenues de synthèse des protéines virales. Des populations virales avec un génome complet pourraient encore être présentes dans des cellules cibles de façon isolé, mais à un niveau si faible qu'il est indétectable sans technique à haut débit tel que le séquençage ARN « *single cell* » (111).

L'émergence très précoce de formes tronquées en région 5'NC dans tous les organes étudiés peut être en partie expliquée par le taux d'erreurs très élevé de l'ARN Polymérase ARN-dépendante des EV-B lors des cycles de réplication successifs du virus, et par l'absence de mécanismes de réparation du génome viral (25).

De façon similaire avec d'autres équipes, nous avons démontré que les formes virales d'EV-B tronqués de 37 à 50nt en région 5'NC étaient des virus peu réplicatifs, mais qui maintenaient une activité de réplication génomique associée à la production de protéines virales telle que la VP1 (*Viral protein 1*) (21–23,326). Ces faibles niveaux de réplication pourraient s'expliquer par des mécanismes de coopération avec des virus au génome complet ou conservant certaines structures indispensables pour l'activité de réplication (délétions de 8-36nt en région 5'NC conservant la tige-boucle « b »). Ces populations réplicatives « *helper* » pourraient fournir des facteurs protéiques nécessaires à la réplication et /ou des modules de séquences nucléotidiques par des mécanismes de recombinaison génétique (111).

Inversement, les populations virales tronquées en région 5'NC de 8 à 36nt pourraient détourner des facteurs de réplication cellulaires et/ou viraux du complexe ribonucléoprotéique (complexe de réplication) expliquant l'effet de compétition constaté dans nos travaux avec les formes virales complètes. La diminution des proportions de formes virales complètes au cours du temps pourrait être expliquée par ce mécanisme de compétition avec des populations virales tronquées réplicatives majoritaires.

Nos résultats suggèrent un avantage sélectif réplicatif des formes virales tronquées en région 5'NC dans des conditions cellulaires spécifiques : par exemple, des niveaux

d'expression différents de certains facteurs de réplication cellulaires, comme la protéine hnRNP-C (*Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), dont l'expression cytoplasmique est diminuée dans les cellules quiescentes, sans division cellulaire (cardiomyocytes, cellules bêta des ilots de Langerhans…) (327). Une réplication génomique indépendante de ces facteurs de réplication classiques pourrait permettre aux formes virales tronquées en région 5'NC de devenir rapidement majoritaires, remplaçant les populations virales dont la réplication est dépendante de hnRNP-C, par exemple.

Les facteurs de restriction intracellulaires constituent de puissantes barrières contre les virus, agissant précocement après l'infection (272,337,338). Les facteurs de restriction jouent un rôle important dans l'organisation de l'immunité cellulaire antivirale, avec une expression tissue-dépendante. Des auteurs ont rapporté que les protéines cellulaires A3G (*Apolipoprotein B mRNAediting enzyme, catalytic polypeptide-like*), une cytidine désaminases humaines, AUF1 (*AU-rich binding factor 1*), une protéine cellulaire impliquée dans la stabilité de l'ARNm et TRIM7 se lient à l'extrémité 5'NC de divers EV-B pour limiter la traduction des protéines virales ou la réplication du génome (101–103). Les populations virales tronquées en région 5'NC pourraient acquérir un avantage réplicatif précoce par rapport aux formes complètes, en perdant les sites de liaison des facteurs de restriction dans des conditions spécifiques cellulaires. Un séquençage ARN « *single cell* » permettrait d'identifier les facteurs de réplication majoritaires dans les cellules avec une majorité de formes virales tronquées.

Nos résultats indiquent que l'émergence et la persistance des formes virales tronquées en région 5'NC associée à l'expression des protéines virales altèrent les fonctions cellulaires, telles que le cytosquelette cardiaque ou la production d'insuline. Il a été démontré que la dégradation de la dystrophine est la conséquence de l'activité de la protéase virale 2A, et était un mécanisme principal aboutissant à la cardiomyopathie dilatée (144). La diminution de la production d'insuline pourrait être liée à l'activité de protéases virales sur les facteurs de traduction cellulaires, notamment en diminuant l'expression de la pro-hormone convertase 2 (PC2) et par la production d'auto-anticorps anti-ilots par mimétisme moléculaire avec les protéases virales, à l'origine du DT1 (13,225).

En résumé, nos résultats montrent que les formes virales tronquées en région 5'NC émergent rapidement dans de nombreux organes chez la souris, mais maintiennent une réplication génomique uniquement dans certains tissus cibles : cœur, pancréas et foie. Un environnement cellulaire particulier, notamment des cellules quiescentes, hors cycle cellulaire, permettrait la génération et le maintien de ces quasi-espèces virales. La persistance de ces

populations virales tronquées en région 5'NC est associée à des lésions chroniques, fonctionnelles, dans le cœur – dégradation de la dystrophine- et dans le pancréas – diminution de l'insuline dans les cellules bêta.

B. Métabolisme insulinique

En utilisant le modèle de souris DBA/2J et de cellules INS-1-E1 (cellules bêta pancréatiques de rat produisant de l'insuline), nous avons étudié l'impact de l'infection par le CVB3/28 sur le métabolisme insulinique. Nos résultats suggèrent que la pancréatite induite par le CVB3/28 chez la souris DBA/2J est associée à une phase d'insulite aiguë puis une phase d'insulinopénie plus tardive, associées à l'émergence et au maintien de populations virales tronquées en région 5'NC. La VP1 était exprimée uniquement dans les cellules bêta pancréatiques produisant de l'insuline, avec une diminution de la production d'insuline à la phase chronique de l'infection.

De manière similaire, les cellules INS-1-E1 infectées par le CVB3/28 ont perdu la capacité de répondre à une concentration élevée de glucose par une sécrétion d'insuline, et ceci de façon similaire à ce qui est observé chez le patient diabétique. D'autres EV humains ont le même impact sur les cellules productrices d'insuline, tels que les échovirus 16 et 30 (152). La transfection des ARN viraux synthétiques tronqués en région 5'NC dans les cellules INS-1-E1 induisait également une diminution de la réponse insulinique au glucose, suggérant que l'infection persistante par ces populations virales tronquées en région 5'NC (quasi-espèces) pourrait moduler de façon chronique le métabolisme insulinique conduisant à un état pré-diabétique.

Dans nos deux modèles expérimentaux, nous avons montré une diminution de l'expression des ARNm d'Ins1 (gène codant pour la préproinsuline) et de PCSK2, gène codant pour la PC2. Les concentrations sanguines de proinsuline étaient également élevées chez les souris infectées à la phase chronique. Plusieurs auteurs ont rapporté une inhibition de la PC2 après l'infection par un EV-B, une enzyme permettant la maturation de la proinsuline en insuline. Son inhibition dans les cellules infectées pourrait perturber la maturation de la proinsuline en insuline, responsable d'une accumulation de proinsuline et de sa sécrétion à la place de l'insuline par les cellules β pancréatiques. Une approche protéomique globale permettrait d'identifier quels facteurs du métabolisme insulinique sont impactés par les

populations virales tronquées en région 5'NC. Des auteurs ont rapporté une augmentation de la proinsuline sérique avant la perturbation de l'équilibre glycémique chez des patients précocement diagnostiqués avec un diabète de type 1 (DT1) (339). Une proinsulinémie élevée constitue ainsi un marqueur prédictif de la survenue d'un DT1 (200). Par ailleurs, il a été montré que la proinsuline joue un rôle majeur dans le développement de l'auto-immunité dirigée contre les cellules β pancréatiques (200,310). Il s'agirait d'un auto-antigène reconnu par les lymphocytes T CD4+ chez les patients avec un DT1.

L'ensemble de ces résultats ouvre la voie vers des stratégies thérapeutiques, notamment vaccinales, contre les infections par les EV-B ayant un tropisme pancréatique, afin de diminuer le risque de développer un DT1 (212). Un vaccin polyvalent contre les CVB, PRV-101, est actuellement en phase I d'essai clinique en Finlande (PROVENT), avec des résultats préliminaires encourageants.

C. Réponse immunitaire innée

Nous avons décrit le profil de la réponse inflammatoire dans un modèle murin d'infection systémique induite par la souche CVB3/28.

Dans le cœur et le pancréas, une augmentation significative des niveaux de MCP1, TNF-α et d'IL-10 a été mise en évidence, en rapport avec les lésions histologiques constatées de myocardite et de pancréatite. Certains auteurs ont montré que des niveaux élevés d'IL-10 et de MCP1 au cours d'une infection aigue pouvaient orienter la réponse immunitaire innée puis acquise vers un profil Th2, plus propice à des infections virales chroniques de type persistante (340,341). Des sécrétions plus faibles d'IL-10 ou de MCP1 dans les autres organes pourrait au contraire améliorer la clairance virale, comme décrit précédemment par certains auteurs.

La réponse IFN-β était faible lors de la phase aiguë de l'infection dans tous les organes cibles. La réponse immunitaire innée médiée par l'IFN-1 est une étape clé dans la progression de l'infection virale aiguë, qui peut évoluer vers une guérison ou une infection chronique (244). Il est intéressant de noter que des délétions en région 5'NC ont été détectées dans le virus de l'hépatite C, le virus de la dengue, le virus de la fièvre aphteuse ou le virus de la peste porcine africaine, soit au cours d'une infection persistante, soit avec une virulence réduite et une faible réponse IFN-β (321–324). Récemment, les EV-B tronqués en région 5'NC présentant les plus grandes délétions (36-50nt) ont été corrélés négativement avec la réponse IFN dans le sang de

patients présentant un sepsis à EV-B (19). De même, le traitement par IFN bêta s'est avéré efficace dans la CMD induite par des EV-B chez l'Homme (335,336).

L'ensemble de ces résultats ouvre la voie aux thérapies immunomodulatrices, par l'exemple l'IFN-β ou les anti-IL-1R (Anakinra) dans les infections persistantes induites par les EV-B et les pathologies associées.

À des temps très précoces (24H), les niveaux d'expression des ARNm d'IFN-β dans le cœur augmentaient de façon transitoire avant une diminution significative. Nous avons montré que les formes virales d'EV-B tronqués en région 5'NC et complètes inoculées ou transfectées modulent les niveaux d'IFN-β dans le cœur de souris DBA/2J et dans les HCM. En particulier, les formes virales tronquées en région 5'NC de plus de 36nt induisent peu ou pas d'IFN-β dans le cœur de souris et dans les HCM. Les formes tronquées en région 5'NC sont la population majoritaire dans le cœur dès 48 heures après l'infection, suggérant que ces formes virales présentant des délétions dans leur région 5'NC pourraient échapper à la réponse immunitaire médiée par les IFN-1. Ceci pourrait être la conséquence d'une différence qualitative de fixation entre les senseurs immunitaires innés cytoplasmiques (RIG-I ou MDA5) et les séquences immunomodulatrices de la région 5'NC des EV-B. L'utilisation de cellules HEK293 avec une expression différentielle des senseurs de l'immunité inné permettra d'identifier le récepteur clé pour chaque forme virale tronquée en région 5'NC.

Afin de confirmer l'importance de la réponse IFN-1 dans les infections cardiaques à EV-B, nous avons utilisé un agoniste non spécifique des voies de signalisation des TLR et des RLR, le Poly(I:C), chez les souris infectées. Nous avons démontré que la stimulation de la voie des IFN-1 permettait de diminuer significativement les niveaux de charge virale des formes tronquées en 5'NC. De plus, ce traitement a permis de diminuer les lésions histologiques de myocardite et la mortalité des souris DBA/2J infectées. Ces résultats démontrent le rôle majeur de l'activation de la voie des IFN-1 pour la clairance des formes virales émergentes de persistance et pour contrôler les lésions histologiques de myocardite, dans un modèle murin d'infection à CVB3/28.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

En résumé, nous avons montré pour la première fois l'émergence précoce de populations majoritaires d'EV-B tronqués en région 5'NC, dont les proportions élevées peuvent réguler négativement l'activité de réplication génomique virale, ainsi que les niveaux d'IFN-1 dans le cœur et le métabolisme insulinique dans le pancréas. Ces deux mécanismes font potentiellement partie d'une stratégie d'échappement à la réponse immunitaire innée de l'hôte à la phase aigüe, permettant la persistance virale dans le cœur et le pancréas, et l'évolution vers des pathologies chroniques, telles que la cardiomyopathie dilatée (CMD) ou le diabète de type 1 (DT1).

L'ensemble de ces résultats permet une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires entourant l'émergence des formes virales tronquées en région 5'NC dans les infections aigues à EV-B et ouvre la voie à des stratégies préventives vaccinales, et des thérapies ciblées antivirales et immunomodulatrices dans les infections aigues et chroniques à EV-B.

Ces travaux seront poursuivis par l'étude de la reconnaissance du domaine I de la région 5'NC du génome des EV-B par les RLR (RIG-I et MDA5), et l'identification du ligand dans un modèle *in vitro* et chez la souris, comme cela a pu être étudié pour d'autres virus (240–242). Des cellules HEK293 et des souris knock-out pour les différents récepteurs permettront d'identifier la séquence immunomodulatrice, ainsi que le récepteur préférentiel de chaque forme virale tronquée en région 5'NC.

Les liens entre l'infection par les EV-B et le génotype cardiaque chez l'Homme seront ensuite examinés. Les infections virales et les mutations génétiques représentent environ 60 % des cas de CMD (139). Les mutations génétiques concernent principalement les gènes codant pour les protéines du cytosquelette, telles que la desmine, la dystrophine, la titine ou la lamine A/C (146). L'expression phénotypique de ces CMD varie de façon importante pour une même mutation (139). Outre les causes génétiques, les EV-B sont les virus les plus fréquemment impliqués dans le développement de la CMD post myocardite.

La question se pose de savoir si un polymorphisme de gènes causant une CMD pourrait rendre les cardiomyocytes humains plus sensibles ou plus résistants à l'infection par les EV-B. L'exposome, et plus particulièrement l'infection et la persistance des EV-B, pourrait expliquer les différences phénotypiques observées chez les patients atteints d'une CMD génétique et porteurs de mutations similaires.

D'autre part, l'inflammation induite par les EV-B dans les cellules cardiaques pourrait déclencher l'expression de facteurs de restriction. Les facteurs de restriction intracellulaires des mammifères sont de puissantes barrières contre les virus. Au cours des quinze dernières années,

il est apparu que le génome humain code pour une série de six enzymes mutatrices de l'ADN simple brin nommées APOBEC3 (*Apolipoprotein B mRNAediting enzyme, catalytic polypeptide-like*) qui limitent la réplication de nombreux micro-organismes, tels que les virus (VIH, CMV, VHC…). Certaines de ces enzymes peuvent générer des mutations dans l'ARN et l'ADN et pourrait induire des cassures d'ADN double brin. Après leur activation au cours de l'infection aigue virale, ces facteurs de restriction peuvent causer des mutations dans le génome humain (gène codant pour les protéines du cytosquelette cardiaque ?) et viral.

L'objectif de mon projet est d'étudier l'impact génétique de la réplication des EV-B par l'expression des APOBEC3 dans des hiPSC-CM (*human-induced pluripotent stem cells-derived into cardiomyocytes)* de patients souffrant de CMD génétiques (**Figure 27**). La compréhension des interactions entre l'exposome viral, le génotype et le phénotype peut ouvrir la voie à de nouvelles stratégies de prévention primaire, de dépistage et de traitements antiviraux chez les patients atteints de CMD génétiques. L'identification de facteurs de risque d'aggravation ou de décès tels qu'une infection cardiaque par les EV-B chez des patients atteints d'une cardiomyopathie génétique justifiera le développement de nouvelles stratégies de vaccination antivirale (classique ou ARNm) ciblée afin de diminuer le risque de mort subite dans cette population à risque.

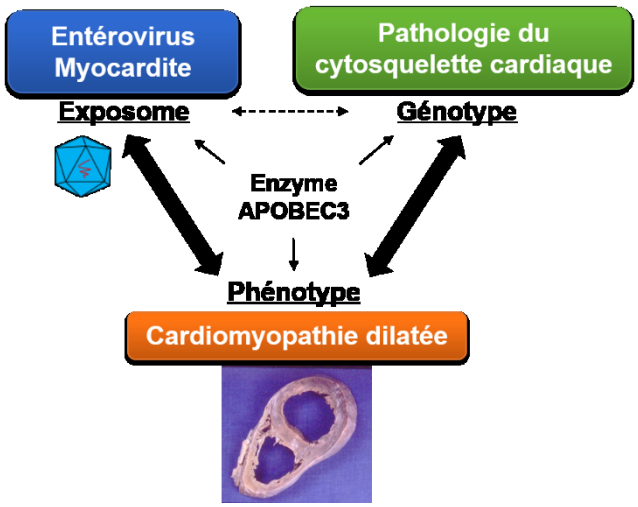


Figure 27 : Schéma illustrant l'hypothèse de mon projet de mobilité - post-doctorat, financé par la Fédération Française de Cardiologie

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bubba L, Broberg EK, Jasir A, Simmonds P, Harvala H, Enterovirus study collaborators. Circulation of non-polio enteroviruses in 24 EU and EEA countries between 2015 and 2017: a retrospective surveillance study. Lancet Infect Dis. mars 2020;20(3):350- 61.

2. Janes VA, Minnaar R, Koen G, van Eijk H, Dijkman-de Haan K, Pajkrt D, et al. Presence of human non-polio enterovirus and parechovirus genotypes in an Amsterdam hospital in 2007 to 2011 compared to national and international published surveillance data: a comprehensive review. Euro Surveill. 20 nov 2014;19(46):20964.

3. Brouwer L, Moreni G, Wolthers KC, Pajkrt D. World-Wide Prevalence and Genotype Distribution of Enteroviruses. Viruses. 8 mars 2021;13(3):434.

4. Molet L, Saloum K, Marque-Juillet S, Garbarg-Chenon A, Henquell C, Schuffenecker I, et al. Enterovirus infections in hospitals of Ile de France region over 2013. J Clin Virol. janv 2016;74:37-42.

5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Enterovirus surveillance--United States, 2002-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 17 févr 2006;55(6):153-6.

6. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA, Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. MMWR Surveill Summ. 15 sept 2006;55(8):1-20.

7. Harvala H, Broberg E, Benschop K, Berginc N, Ladhani S, Susi P, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. J Clin Virol. avr 2018;101:11-7.

8. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. J Pathol. janv 2015;235(2):217-28.

9. Morriss FH, Lindower JB, Bartlett HL, Atkins DL, Kim JO, Klein JM, et al. Neonatal Enterovirus Infection: Case Series of Clinical Sepsis and Positive Cerebrospinal Fluid Polymerase Chain Reaction Test with Myocarditis and Cerebral White Matter Injury Complications. AJP Rep. juill 2016;6(3):e344-51.

10. Andréoletti L, Lévêque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P. Viral causes of human myocarditis. Arch Cardiovasc Dis. juill 2009;102(6-7):559-68.

11. Sasidharan A, Hassan WM, Harrison CJ, Hassan F, Selvarangan R. Host Immune Response to Enterovirus and Parechovirus Systemic Infections in Children. Open Forum Infect Dis. août 2020;7(8):ofaa261.

12. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. Immunity. avr 2019;50(4):907-23.

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

14. Li Y, Bourlet T, Andreoletti L, Mosnier JF, Peng T, Yang Y, et al. Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. Circulation. 25 janv 2000;101(3):231-4.

15. Tam PE, Messner RP. Molecular Mechanisms of Coxsackievirus Persistence in Chronic Inflammatory Myopathy: Viral RNA Persists through Formation of a Double-Stranded Complex without Associated Genomic Mutations or Evolution. J Virol. déc 1999;73(12):10113-21.

16. Cunningham L, Bowles NE, Lane RJ, Dubowitz V, Archard LC. Persistence of enteroviral RNA in chronic fatigue syndrome is associated with the abnormal production of equal amounts of positive and negative strands of enteroviral RNA. J Gen Virol. juin 1990;71 (Pt 6):1399-402.

17. Alidjinou EK, Engelmann I, Bossu J, Villenet C, Figeac M, Romond MB, et al. Persistence of Coxsackievirus B4 in pancreatic ductal-like cells results in cellular and viral changes. Virulence. 23 janv 2017;8(7):1229-44.

18. Oldstone MBA. Viral persistence: Parameters, mechanisms and future predictions. Virology. 5 janv 2006;344(1):111-8.

19. Glenet M, N'Guyen Y, Mirand A, Henquell C, Lebreil AL, Berri F, et al. Major 5′terminally deleted enterovirus populations modulate type I IFN response in acute myocarditis patients and in human cultured cardiomyocytes. Scientific Reports. 20 juill 2020;10(1):11947.

20. Bouin A, Nguyen Y, Wehbe M, Renois F, Fornes P, Bani-Sadr F, et al. Major Persistent 5′ Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in Human Endomyocardial Tissues. Emerg Infect Dis. août 2016;22(8):1488-90.

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

22. Kim KS, Tracy S, Tapprich W, Bailey J, Lee CK, Kim K, 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. Journal of Virology. 1 juin 2005;79(11):7024-41.

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

24. Bouin A, Gretteau PA, Wehbe M, Renois F, N'Guyen Y, Lévêque N, 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. 14 mai 2019;139(20):2326-38.

25. Chapman NM. Persistent Enterovirus Infection: Little Deletions, Long Infections. Vaccines. 12 mai 2022;10(5):770.

26. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. J Gen Virol. 2017;98:2421-2.

27. Zell R. Picornaviridae-the ever-growing virus family. Arch Virol. 2018;163:299-317.

28. Racaniello VR. Picornaviridae : The viruses and Their Replication. In: Fields Virology. New York: Knipe & Howley; 2013.

29. Antona D, Lévêque N, Chomel JJ, Dubrou S, Lévy-Bruhl D, Lina B. Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. juin 2007;26(6):403-12.

30. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. Nucleic Acids Res. 2019;47:256-9.

31. Glenet M, Heng L, Callon D, Lebreil AL, Gretteau PA, Nguyen Y, et al. Structures and Functions of Viral 5′ Non-Coding Genomic RNA Domain-I in Group-B Enterovirus Infections. Viruses. 21 août 2020;12(9):919.

32. Lin JY, Chen TC, Weng KF, Chang SC, Chen LL, Shih SR. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. J Biomed Sci. 20 nov 2009;16:103.

33. Jiang P, Liu Y, Ma HC, Paul AV, Wimmer E. Picornavirus morphogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. sept 2014;78(3):418-37.

34. Rossmann MG. The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. J Biol Chem. 5 sept 1989;264(25):14587-90.

35. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. Nat Rev Microbiol. juin 2018;16(6):368-81.

36. Laitinen OH, Svedin E, Kapell S, Nurminen A, Hytönen VP, Flodström-Tullberg M. Enteroviral proteases: structure, host interactions and pathogenicity. Rev Med Virol. juill 2016;26(4):251-67.

37. Andino R, Böddeker N, Silvera D, Gamarnik AV. Intracellular determinants of picornavirus replication. Trends in Microbiology. 1 févr 1999;7(2):76-82.

38. Guo H, Li Y, Liu G, Jiang Y, Shen S, Bi R, et al. A second open reading frame in human enterovirus determines viral replication in intestinal epithelial cells. Nat Commun. 2019;10:4066.

39. Pathak HB, Arnold JJ, Wiegand PN, Hargittai MRS, Cameron CE. Picornavirus genome replication: assembly and organization of the VPg uridylylation ribonucleoprotein (initiation) complex. J Biol Chem. 2007;282:16202-13.

40. Sun Y, Guo Y, Lou Z. Formation and working mechanism of the picornavirus VPg uridylylation complex. Current Opinion in Virology. déc 2014;9:24-30.

41. Steil BP, Barton DJ. Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. Virus Res. févr 2009;139(2):240-52.

42. Liu Y, Wimmer E, Paul AV. Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. Biochim Biophys Acta. 2009;495-517.

43. Renois F, Bouin A, Wehbe M, Leveque N, Andreoletti L. Infections persistantes à entérovirus et pathologies humaines. Virologie (Montrouge). 1 déc 2014;18(6):306-24.

44. Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. Picornavirus-receptor interactions. Trends Microbiol. juill 2002;10(7):324-31.

45. Sharma M, Mishra B, Saikia UN, Bahl A, Ratho RK, Talwar KK. Role of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) expression and viral load of adenovirus and enterovirus in patients with dilated cardiomyopathy. Arch Virol. janv 2016;161(1):87-94.

46. Yang B, Chuang H, Yang KD. Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. Virol J. 2009;6(1):141.

47. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. Cell. 10 mars 1989;56(5):855-65.

48. Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, et al. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. J Virol. mai 2012;86(10):5686-96.

49. Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. Front Microbiol. 2012;3:105.

50. Yamayoshi S, Fujii K, Koike S. Receptors for enterovirus 71. Emerg Microbes Infect. juill 2014;3(7):e53.

51. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. Viruses. 11 janv 2016;8(1):E16.

52. Baggen J, Hurdiss DL, Zocher G, Mistry N, Roberts RW, Slager JJ, et al. Role of enhanced receptor engagement in the evolution of a pandemic acute hemorrhagic conjunctivitis virus. Proc Natl Acad Sci USA. 9 janv 2018;115(2):397-402.

53. Baggen J, Thibaut HJ, Staring J, Jae LT, Liu Y, Guo H, et al. Enterovirus D68 receptor requirements unveiled by haploid genetics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2 févr 2016;113(5):1399-404.

54. Hofer F, Gruenberger M, Kowalski H, Machat H, Huettinger M, Kuechler E, et al. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 mars 1994;91(5):1839-42.

55. Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. Cell. 10 mars 1989;56(5):839-47.

56. Bochkov YA, Watters K, Ashraf S, Griggs TF, Devries MK, Jackson DJ, et al. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 28 avr 2015;112(17):5485-90.

57. Bergelson JM, Chan M, Solomon KR, St John NF, Lin H, Finberg RW. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 21 juin 1994;91(13):6245-8.

58. Martino TA, Petric M, Weingartl H, Bergelson JM, Opavsky MA, Richardson CD, et al. The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus. Virology. 25 mai 2000;271(1):99-108.

59. Williams CH, Kajander T, Hyypiä T, Jackson T, Sheppard D, Stanway G. Integrin alpha v beta 6 is an RGD-dependent receptor for coxsackievirus A9. J Virol. juill 2004;78(13):6967-73.

60. Bergelson JM, Shepley MP, Chan BM, Hemler ME, Finberg RW. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. Science. 27 mars 1992;255(5052):1718-20.

61. Lin HY, Yang YT, Yu SL, Hsiao KN, Liu CC, Sia C, et al. Caveolar endocytosis is required for human PSGL-1-mediated enterovirus 71 infection. J Virol. août 2013;87(16):9064-76.

62. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. Cell. 13 janv 2006;124(1):119-31.

63. Owino CO, Chu JJH. Recent advances on the role of host factors during non-poliovirus enteroviral infections. J Biomed Sci. déc 2019;26(1):47.

64. Molla A, Paul AV, Schmid M, Jang SK, Wimmer E. Studies on dicistronic polioviruses implicate viral proteinase 2Apro in RNA replication. Virology. oct 1993;196(2):739-47.

65. de Jong AS, Wessels E, Dijkman HBPM, Galama JMD, Melchers WJG, Willems PHGM, et al. Determinants for membrane association and permeabilization of the coxsackievirus 2B protein and the identification of the Golgi complex as the target organelle. J Biol Chem. 10 janv 2003;278(2):1012-21.

66. Banerjee R, Tsai W, Kim W, Dasgupta A. Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3’ terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b. Virology. 2001;280:41-51.

67. Wang C, Ma HC, Wimmer E, Jiang P, Paul AV. A C-terminal, cysteine-rich site in poliovirus 2C(ATPase) is required for morphogenesis. J Gen Virol. juin 2014;95(Pt 6):1255-65.

68. Wessels E, Duijsings D, Lanke KHW, van Dooren SHJ, Jackson CL, Melchers WJG, et al. Effects of picornavirus 3A Proteins on Protein Transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. J Virol. déc 2006;80(23):11852-60.

69. Paul AV, Wimmer E. Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. Virus Res. 2015;206:12-26.

70. Peersen OB. Picornaviral polymerase structure, function, and fidelity modulation. Virus Res. 15 avr 2017;234:4-20.

71. Yi EJ, Shin YJ, Kim JH, Kim TG, Chang SY. Enterovirus 71 infection and vaccines. Clin Exp Vaccine Res. janv 2017;6(1):4-14.

72. Kempf BJ, Barton DJ. Picornavirus RNA polyadenylation by 3Dpol, the viral RNA-dependent RNA polymerase. Virus Res. 3 août 2015;206:3-11.

73. Woodman A, Arnold JJ, Cameron CE, Evans DJ. Biochemical and genetic analysis of the role of the viral polymerase in enterovirus recombination. Nucleic Acids Res. 2016;44:6883-95.

74. Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. Genes Dev. 1998;12:2293-304.

75. Murray KE, Roberts AW, Barton DJ. Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. RNA. 2001;N. Y. N 7:1126-41.

76. Walter BL, Parsley TB, Ehrenfeld E, Semler BL. Distinct poly(rC) binding protein KH domain determinants for poliovirus translation initiation and viral RNA replication. J Virol. 2002;76:12008-22.

77. Bedard KM, Daijogo S, Semler BL. A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. EMBO J. 2007;26:459-67.

78. Gamarnik AV, Andino R. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5’ noncoding region of poliovirus RNA. RNA. 1997;N. Y. N 3:882-92.

79. Zell R, Ihle Y, Effenberger M, Seitz S, Wutzler P, Görlach M. Interaction of poly(rC)-binding protein 2 domains KH1 and KH3 with coxsackievirus RNA. Biochem Biophys Res Commun. 2008;377:500-3.

80. Zell R, Ihle Y, Seitz S, Gündel U, Wutzler P, Görlach M. Poly(rC)-binding protein 2 interacts with the oligo(rC) tract of coxsackievirus B3. Biochem Biophys Res Commun. 2008;366:917-21.

81. Harris KS, Xiang W, Alexander L, Lane WS, Paul AV, Wimmer E. 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. 1994;269:27004-14.

82. Cheung P, Zhang M, Yuan J, Chau D, Yanagawa B, McManus B, et al. Specific interactions of HeLa cell proteins with Coxsackievirus B3 RNA: La autoantigen binds differentially to multiple sites within the 5' untranslated region. Virus Res. 2002;90:23-36.

83. Cheung P, Lim T, Yuan J, Zhang M, Chau D, McManus B, et al. Specific interaction of HeLa cell proteins with coxsackievirus B3 3'UTR: La autoantigen binds the 3' and 5'UTR independently of the poly(A) tail. Cell Microbiol. 2007;9:1705-15.

84. Lin JY, Li ML, Huang PN, Chien KY, Horng JT, Shih SR. Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with the enterovirus 71 5' untranslated region and participates in virus replication. J Gen Virol. 2008;89:2540-9.

85. Levengood JD, Tolbert M, Li ML, Tolbert BS. High-affinity interaction of hnRNP A1 with conserved RNA structural elements is required for translation and replication of enterovirus 71. RNA Biol. 2013;10:1136-45.

86. Lin JY, Shih SR, Pan M, Li C, Lue CF, Stollar V, et al. hnRNP A1 interacts with the 5' untranslated regions of enterovirus 71 and Sindbis virus RNA and is required for viral replication. J Virol. 2009;83:6106-14.

87. Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. Annu Rev Biochem. 1993;62:289-321.

88. Brunner JE, Nguyen JHC, Roehl HH, Ho TV, Swiderek KM, Semler BL. Functional Interaction of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C with Poliovirus RNA Synthesis Initiation Complexes. J Virol. 15 mars 2005;79(6):3254-66.

89. Barton DJ, O'Donnell BJ, Flanegan JB. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. EMBO J. 2001;20:1439-48.

90. Herold J, Andino R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. Mol Cell. 2001;7:581-91.

91. Svitkin YV, Costa-Mattioli M, Herdy B, Perreault S, Sonenberg N. Stimulation of picornavirus replication by the poly(A) tail in a cell-free extract is largely independent of the poly(A) binding protein (PABP. RNA. 2007;N. Y. N 13:2330-40.

92. Molla A, Harris KS, Paul AV, Shin SH, Mugavero J, Wimmer E. Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. J Biol Chem. 1994;269:27015-20.

93. Andino R, Rieckhof GE, Baltimore D. A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. Cell. 1990;63:369-80.

94. Claridge JK, Headey SJ, Chow JYH, Schwalbe M, Edwards PJ, Jeffries CM, et al. A picornaviral loop-to-loop replication complex. J Struct Biol. 2009;166:251-62.

95. Headey SJ, Huang H, Claridge JK, Soares GA, Dutta K, Schwalbe M, et al. NMR structure of stem-loop D from human rhinovirus-14. RNA. 2007;N. Y. N 13:351-60.

96. Ohlenschläger O, Wöhnert J, Bucci E, Seitz S, Häfner S, Ramachandran R, et al. The structure of the stemloop D subdomain of coxsackievirus B3 cloverleaf RNA and its interaction with the proteinase 3C. Struct Lond Engl. 2004;12:237-48.

97. Sharma N, Ogram SA, Morasco BJ, Spear A, Chapman NM, Flanegan JB. Functional role of the 5' terminal cloverleaf in Coxsackievirus RNA replication. Virology. 2009;393:238-49.

98. Rieder E, Xiang W, Paul A, Wimmer E. Analysis of the cloverleaf element in a human rhinovirus type 14/poliovirus chimera: correlation of subdomain D structure, ternary protein complex formation and virus replication. J Gen Virol. 2003;84:2203-16.

99. Andino R, Rieckhof GE, Achacoso PL, Baltimore D. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. EMBO J. 1993;12:3587-98.

100. Cornell CT, Semler BL. Subdomain specific functions of the RNA polymerase region of poliovirus 3CD polypeptide. Virology. 2002;298:200-13.

101. Li Z, Yang X, Zhao Z, Liu X, Zhang W. Host Restriction Factor A3G Inhibits the Replication of Enterovirus D68 by Competitively Binding the 5' Untranslated Region with PCBP1. J Virol. 26 janv 2022;96(2):e0170821.

102. Fan W, Mar KB, Sari L, Gaszek IK, Cheng Q, Evers BM, et al. TRIM7 inhibits enterovirus replication and promotes emergence of a viral variant with increased pathogenicity. Cell. juin 2021;184(13):3410-3425.e17.

103. Cathcart AL, Rozovics JM, Semler BL. Cellular mRNA Decay Protein AUF1 Negatively Regulates Enterovirus and Human Rhinovirus Infections. Journal of Virology. oct 2013;87(19):10423-34.

104. Dave P, George B, Balakrishnan S, Sharma DK, Raheja H, Dixit NM, et al. Strand-specific affinity of host factor hnRNP C1/C2 guides positive to negative-strand ratio in Coxsackievirus B3 infection. RNA Biol. 2019;16:1286-99.

105. Almendral JM. Assembly of simple icosahedral viruses. Subcell Biochem. 2013;68:307-28.

106. Novak JE, 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. juin 1991;65(6):3384-7.

107. Nomoto A, Kitamura N, Golini F, Wimmer E. The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. Proc Natl Acad Sci USA. déc 1977;74(12):5345-9.

108. Kruse I, Peyret H, Saxena P, Lomonossoff GP. Encapsidation of Viral RNA in Picornavirales: Studies on Cowpea Mosaic Virus Demonstrate Dependence on Viral Replication. J Virol. 15 janv 2019;93(2):e01520-18.

109. Muslin C, Joffret ML, Pelletier I, Blondel B, Delpeyroux F. Evolution and Emergence of Enteroviruses through Intra- and Inter-species Recombination: Plasticity and Phenotypic Impact of Modular Genetic Exchanges in the 5' Untranslated Region. Lauring A, éditeur. PLoS Pathog. 12 nov 2015;11(11):e1005266.

110. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions within a viral population. Nature. 19 janv 2006;439(7074):344-8.

111. Domingo E, Perales C. Viral quasispecies. PLoS Genet. 17 oct 2019;15(10):e1008271.

112. Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. PLoS Pathog. oct 2005;1(2):e11.

113. Aguado LC, Jordan TX, Hsieh E, Blanco-Melo D, Heard J, Panis M, et al. Homologous recombination is an intrinsic defense against antiviral RNA interference. Proc Natl Acad Sci USA. 25 sept 2018;115(39):E9211-9.

114. Holmblat B, Jégouic S, Muslin C, Blondel B, Joffret ML, Delpeyroux F. Nonhomologous Recombination between Defective Poliovirus and Coxsackievirus Genomes Suggests a New Model of Genetic Plasticity for Picornaviruses. Racaniello V, éditeur. mBio. 5 août 2014;5(4):e01119-14.

115. Wang H, Cui X, Cai X, An T. Recombination in Positive-Strand RNA Viruses. Front Microbiol. 2022;13:870759.

116. Oberste MS, Peñaranda S, Pallansch MA. RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. J Virol. mars 2004;78(6):2948-55.

117. Simmonds P, Welch J. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. J Virol. janv 2006;80(1):483-93.

118. Domingo E, Perales C. Quasispecies and virus. Eur Biophys J. 1 mai 2018;47(4):443-57.

119. Nasri D, Bouslama L, Omar S, Saoudin H, Bourlet T, Aouni M, et al. Typing of Human Enterovirus by Partial Sequencing of VP2. J Clin Microbiol. août 2007;45(8):2370-9.

120. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. J Clin Microbiol. août 2006;44(8):2698-704.

121. Saarinen NVV, Lehtonen J, Veijola R, Lempainen J, Knip M, Hyöty H, et al. Multiplexed High-Throughput Serological Assay for Human Enteroviruses. Microorganisms. 26 juin 2020;8(6):E963.

122. Nekoua MP, Yessoufou A, Alidjinou EK, Badia-Boungou F, Moutairou K, Sane F, et al. Salivary anti-coxsackievirus-B4 neutralizing activity and pattern of immune parameters in patients with type 1 diabetes: a pilot study. Acta Diabetol. août 2018;55(8):827-34.

123. Chen FH, Liu X, Fang HL, Nan N, Li Z, Ning NZ, et al. VP1 of Enterovirus 71 Protects Mice Against Enterovirus 71 and Coxsackievirus B3 in Lethal Challenge Experiment. Front Immunol. 2019;10:2564.

124. Yee PTI, Poh CL. T Cell Immunity To Enterovirus 71 Infection In Humans And Implications For Vaccine Development. Int J Med Sci. 2018;15(11):1143-52.

125. Vogt MR, Crowe JE. Current Understanding of Humoral Immunity to Enterovirus D68. J Pediatric Infect Dis Soc. 26 déc 2018;7(suppl_2):S49-53.

126. Andréoletti L, Renois F, Jacques J, Lévêque N. Entérovirus non poliomyélitiques et pathologies respiratoires. Med Sci (Paris). nov 2009;25(11):921-30.

127. Tam PE, Fontana DR, Messner RP. Coxsackievirus B1–induced chronic inflammatory myopathy: differences in induction of autoantibodies to muscle and nuclear antigens by cloned myopathic and amyopathic viruses. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. sept 2003;142(3):196-204.

128. Caforio ALP, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, 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. European Heart Journal. 1 sept 2013;34(33):2636-48.

129. Takita M, Jimbo E, Fukui T, Aida K, Shimada A, Oikawa Y, et al. Unique Inflammatory Changes in Exocrine and Endocrine Pancreas in Enterovirus-Induced Fulminant Type 1 Diabetes. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1 oct 2019;104(10):4282-94.

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

131. Callen J, Paes BA. A case report of a premature infant with coxsackie B1 meningitis. Adv Neonatal Care. oct 2007;7(5):238-47.

132. Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse Interference: How Viruses Fight the Interferon System. Viral Immunology. déc 2004;17(4):498-515.

133. Lee YP, Wang YF, Wang JR, Huang SW, Yu CK. Enterovirus 71 blocks selectively type I interferon production through the 3C viral protein in mice. Journal of Medical Virology. nov 2012;84(11):1779-89.

134. Dobrikov MI, Dobrikova EY, McKay ZP, Kastan JP, Brown MC, Gromeier M. PKR Binds Enterovirus IRESs, Displaces Host Translation Factors, and Impairs Viral Translation to Enable Innate Antiviral Signaling. Shenk T, éditeur. mBio. 28 juin 2022;13(3):e00854-22.

135. Genoni A, Canducci F, Rossi A, Broccolo F, Chumakov K, Bono G, et al. Revealing enterovirus infection in chronic human disorders: An integrated diagnostic approach. Sci Rep. déc 2017;7(1):5013.

136. Cannata' A, Artico J, Gentile P, Merlo M, Sinagra G. Myocarditis evolving in cardiomyopathy: when genetics and offending causes work together. Eur Heart J Suppl. mars 2019;21(Suppl B):B90-5.

137. Tauriainen S, Oikarinen S, Oikarinen M, Hyöty H. Enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. Semin Immunopathol. janv 2011;33(1):45-55.

138. Spotnitz MD, Lesch M. Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus) myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis. Prog Cardiovasc Dis. 2006;49:42-57.

139. Schultheiss HP, Fairweather D, Caforio ALP, Escher F, Hershberger RE, Lipshultz SE, et al. Dilated cardiomyopathy. Nat Rev Dis Primers. déc 2019;5(1):32.

140. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, et al. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. Proc Natl Acad Sci USA. janv 1992;89(1):314-8.

141. Hober D, Andreoletti L, Shen L, Copin MC, Desmidt A, Wattré P. Coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis in mouse: use of whole blood culture to study the activation of TNF alpha-producing cells. Microbiol Immunol. 1996;40(11):837-45.

142. Chang CS, Liao CC, Liou AT, Chang YS, Chang YT, Tzeng BH, et al. Enterovirus 71 targets the cardiopulmonary system in a robust oral infection mouse model. Sci Rep. 2019;9:11108.

143. Andréoletti L, Hober D, Becquart P, Belaich S, Copin MC, Lambert V, 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. juin 1997;52(2):206-14.

144. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, et al. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: Evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. Nat Med. mars 1999;5(3):320-6.

145. Xiong D, Lee GH, Badorff C, Dorner A, Lee S, Wolf P, et al. Dystrophin deficiency markedly increases enterovirus-induced cardiomyopathy: A genetic predisposition to viral heart disease. Nat Med. août 2002;8(8):872-7.

146. Hershberger RE, Morales A, Siegfried JD. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: A review for genetics professionals. Genet Med. nov 2010;12(11):655-67.

147. Krogvold L, Edwin B, Buanes T, Frisk G, Skog O, Anagandula M, et al. Detection of a Low-Grade Enteroviral Infection in the Islets of Langerhans of Living Patients Newly Diagnosed With Type 1 Diabetes. Diabetes. mai 2015;64(5):1682-7.

148. Hayakawa T, Nakano Y, Hayakawa K, Yoshimatu H, Hori Y, Yamanishi K, et al. Fulminant type 1 diabetes mellitus associated with Coxsackievirus type B1 infection during pregnancy: a case report. J Med Case Reports. déc 2019;13(1):186.

149. Oikarinen M, Tauriainen S, Oikarinen S, Honkanen T, Collin P, Rantala I, et al. Type 1 diabetes is associated with enterovirus infection in gut mucosa. Diabetes. mars 2012;61(3):687-91.

150. Akhbari P, Richardson SJ, Morgan NG. Type 1 Diabetes: Interferons and the Aftermath of Pancreatic Beta-Cell Enteroviral Infection. Microorganisms. 15 sept 2020;8(9):1419.

151. Nekoua MP, Bertin A, Sane F, Alidjinou EK, Lobert D, Trauet J, et al. Pancreatic beta cells persistently infected with coxsackievirus B4 are targets of NK cell-mediated cytolytic activity. Cell Mol Life Sci CMLS. 2020;77:179-94.

152. Sarmiento L, Medina A, Aziz K, Anagandula M, Cabrera-Rode E, Fex M, et al. Differential effects of three echovirus strains on cell lysis and insulin secretion in beta cell derived lines: Echoviral Infection on Beta Cell Derived Lines. J Med Virol. juin 2016;88(6):971-8.

153. Phillips M, Robinowitz M, Higgins JR, Boran KJ, Reed T, Virmani R. Sudden cardiac death in Air Force recruits. A 20-year review. JAMA. 21 nov 1986;256(19):2696-9.

154. Priori S. Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. European Heart Journal. 15 août 2001;22(16):1374-450.

155. Maron BJ, Haas TS, Ahluwalia A, Murphy CJ, Garberich RF. Demographics and Epidemiology of Sudden Deaths in Young Competitive Athletes: From the United States National Registry. Am J Med. nov 2016;129(11):1170-7.

156. Basso C, Aguilera B, Banner J, Cohle S, d'Amati G, de Gouveia RH, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. Virchows Arch. déc 2017;471(6):691-705.

157. on behalf of the Association for European Cardiovascular Pathology, Basso C, Burke M, Fornes P, Gallagher PJ, de Gouveia RH, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. Virchows Arch. janv 2008;452(1):11-8.

158. Fornès P, Callon D. L'autopsie : indispensable pour la connaissance et la prévention de la mort subite cardiaque. Annales de Pathologie. févr 2021;41(1):85-96.

159. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. Am J Cardiovasc Pathol. janv 1987;1(1):3-14.

160. Cooper LT. Myocarditis. N Engl J Med. 9 avr 2009;360(15):1526-38.

161. Baughman KL. Diagnosis of Myocarditis: Death of Dallas Criteria. Circulation. 31 janv 2006;113(4):593-5.

162. Callon D, Guedra A, Lebreil AL, Rambaud C, Fornés P, Andreoletti L. Fulminant Myocardial Involvement in Neonatal Echovirus-induced Sepsis. Two Autopsy Cases. Pediatr Infect Dis J. 1 févr 2022;41(2):148-50.

163. Atallah-Yunes SA, Kadado AJ, Kaufman GP, Hernandez-Montfort J. Immune checkpoint inhibitor therapy and myocarditis: a systematic review of reported cases. J Cancer Res Clin Oncol. 1 juin 2019;145(6):1527-57.

164. Mirabel M, Callon D, Bruneval P, Lebreil AL, Mousseaux E, Oudard S, et al. Late-Onset Giant Cell Myocarditis Due to Enterovirus During Treatment With Immune Checkpoint Inhibitors. JACC CardioOncol. sept 2020;2(3):511-4.

165. Neagu O, Rodríguez AF, Callon D, Andréoletti L, Cohen MC. Myocarditis Presenting as Sudden Death in Infants and Children: A Single Centre Analysis by ESGFOR Study Group. Pediatr Dev Pathol. 19 avr 2021;10935266211007262.

166. Callon D, Berri F, Lebreil AL, Fornès P, Andreoletti L. Coinfection of Parvovirus B19 with Influenza A/H1N1 Causes Fulminant Myocarditis and Pneumonia. An Autopsy Case Report. Pathogens. 29 juill 2021;10(8):958.

167. Bock CT, Klingel K, Kandolf R. Human Parvovirus B19–Associated Myocarditis. N Engl J Med. avr 2010;362(13):1248-9.

168. Fairweather D, Stafford KA, Sung YK. Update on coxsackievirus B3 myocarditis. Curr Opin Rheumatol. juill 2012;24(4):401-7.

169. N'Guyen Y, Lesaffre F, Metz D, Tassan S, Saade Y, Boulagnon C, et al. Enterovirus but not Parvovirus B19 is associated with idiopathic dilated cardiomyopathy and endomyocardial CD3, CD68, or HLA-DR expression. Journal of Medical Virology. 2017;89(1):55-63.

170. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and Clinical Aspects of Human Herpesvirus 6 Infections. Clin Microbiol Rev. avr 2015;28(2):313-35.

171. Burton JL, Saegeman V, Arribi A, Rello J, Andreoletti L, Cohen MC, et al. Postmortem microbiology sampling following death in hospital: an ESGFOR task force consensus statement. J Clin Pathol. mai 2019;72(5):329-36.

172. Kühl U, Schultheiss HP. Viral myocarditis. Swiss Medical Weekly [Internet]. 21 sept 2014 [cité 27 juill 2022];(39). Disponible sur: https://smw.ch/article/doi/smw.2014.14010

173. Huber SA. Viral Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy: Etiology and Pathogenesis. Curr Pharm Des. 2016;22:408-26.

174. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, 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. 11 avr 2006;113(14):1807-16.

175. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Eur Heart J. janv 2008;29(2):270-6.

176. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. Card Fail Rev. avr 2017;3(1):7-11.

177. Imanaka-Yoshida K. Inflammation in myocardial disease: From myocarditis to dilated cardiomyopathy. Pathol Int. janv 2020;70(1):1-11.

178. Tracy S, Höfling K, Pirruccello S, Lane PH, Reyna SM, Gauntt CJ. Group B coxsackievirus myocarditis and pancreatitis: Connection between viral virulence phenotypes in mice. Journal of Medical Virology. 2000;62(1):70-81.

179. Kawai C. From Myocarditis to Cardiomyopathy: Mechanisms of Inflammation and Cell Death: Learning From the Past for the Future. Circulation. 2 mars 1999;99(8):1091-100.

180. Guimier A, Gordon CT, Godard F, Ravenscroft G, Oufadem M, Vasnier C, et al. Biallelic PPA2 Mutations Cause Sudden Unexpected Cardiac Arrest in Infancy. Am J Hum Genet. 1 sept 2016;99(3):666-73.

181. Belkaya S, Kontorovich AR, Byun M, Mulero-Navarro S, Bajolle F, Cobat A, et al. Autosomal Recessive Cardiomyopathy Presenting as Acute Myocarditis. Journal of the American College of Cardiology. avr 2017;69(13):1653-65.

182. Buob A, Siaplaouras S, Janzen I, Schwaab B, Hammer B, Schneider G, et al. Focal Parvovirus B19 Myocarditis in a Patient with Brugada Syndrome: Cardiology in Review. janv 2003;11(1):45-9.

183. Juhasz Z, Tiszlavicz L, Kele B, Terhes G, Deak J, Rudas L, et al. Sudden cardiac death from parvovirus B19 myocarditis in a young man with Brugada syndrome. Journal of Forensic and Legal Medicine. juill 2014;25:8-13.

184. Salerno F, Girerd N, Chalabreysse L, Billaud G, Lina B, Chevalier P. Myocarditis and cardiac channelopathies: A deadly association? International Journal of Cardiology. mars 2011;147(3):468-70.

185. Frustaci A, Verardo R, Caldarulo M, Acconcia MC, Russo MA, Chimenti C. Myocarditis in hypertrophic cardiomyopathy patients presenting acute clinical deterioration. European Heart Journal. 28 févr 2007;28(6):733-40.

186. Bowles NE, Ni J, Marcus F, Towbin JA. The detection of cardiotropic viruses in the myocardium of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology. mars 2002;39(5):892-5.

187. Campuzano O, Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Sanchez O, Cesar S, Mademont I, et al. A Genetically Vulnerable Myocardium May Predispose to Myocarditis. Journal of the American College of Cardiology. déc 2015;66(25):2913-4.

188. Fung G, Wong J, Berhe F, Mohamud Y, Xue YC, Luo H. Phosphorylation and degradation of αB-crystallin during enterovirus infection facilitates viral replication and induces viral pathogenesis. Oncotarget. 26 sept 2017;8(43):74767-80.

189. Alam S, Abdullah CS, Aishwarya R, Morshed M, Nitu SS, Miriyala S, et al. Dysfunctional Mitochondrial Dynamic and Oxidative Phosphorylation Precedes Cardiac Dysfunction in R120G-αB-Crystallin-Induced Desmin-Related Cardiomyopathy. J Am Heart Assoc. déc 2020;9(23):e017195.

190. Sharma AN, Stultz JR, Bellamkonda N, Amsterdam EA. Fulminant Myocarditis: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Management. Am J Cardiol. 15 déc 2019;124(12):1954-60.

191. Ammirati E, Bizzi E, Veronese G, Groh M, Van de Heyning CM, Lehtonen J, et al. Immunomodulating Therapies in Acute Myocarditis and Recurrent/Acute

Pericarditis. Frontiers in Medicine [Internet]. 2022 [cité 28 juill 2022];9. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.838564

192. Tschöpe C, Cooper LT, Torre-Amione G, Van Linthout S. Management of Myocarditis-Related Cardiomyopathy in Adults. Circulation Research. 24 mai 2019;124(11):1568-83.

193. Mayerle J, Sendler M, Hegyi E, Beyer G, Lerch MM, Sahin-Tóth M. Genetics, Cell Biology, and Pathophysiology of Pancreatitis. Gastroenterology. mai 2019;156(7):1951-1968.e1.

194. Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. Lancet. 4 juill 2015;386(9988):85-96.

195. Wang GJ, Gao CF, Wei D, Wang C, Ding SQ. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. World J Gastroenterol. 28 mars 2009;15(12):1427-30.

196. Simons-Linares CR, Imam Z, Chahal P. Viral-Attributed Acute Pancreatitis: A Systematic Review. Dig Dis Sci. juill 2021;66(7):2162-72.

197. Das SLM, Singh PP, Phillips ARJ, Murphy R, Windsor JA, Petrov MS. Newly diagnosed diabetes mellitus after acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. Gut. 1 mai 2014;63(5):818-31.

198. Richardson A, Park WG. Acute pancreatitis and diabetes mellitus: a review. Korean J Intern Med. janv 2021;36(1):15-24.

199. Gornik I, Vujaklija A, Lukić E, Madzarac G, Gasparović V. Hyperglycemia in sepsis is a risk factor for development of type II diabetes. J Crit Care. juin 2010;25(2):263-9.

200. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. Lancet. 4 janv 2014;383(9911):69-82.

201. Patterson CC, Karuranga S, Salpea P, Saeedi P, Dahlquist G, Soltesz G, et al. Worldwide estimates of incidence, prevalence and mortality of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. Diabetes Res Clin Pract. nov 2019;157:107842.

202. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of Type 1 Diabetes. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 1 sept 2010;39(3):481-97.

203. Piffaretti C, Mandereau-Bruno L, Guilmin-Crepon S, Choleau C, Coutant R, Fosse-Edorh S. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in France, 2010-2015. Diabetes Res Clin Pract. mars 2019;149:200-7.

204. Abela AG, Fava S. Why is the Incidence of Type 1 Diabetes Increasing? Curr Diabetes Rev. 2021;17(8):e030521193110.

205. Precechtelova J, Borsanyiova M, Sarmirova S, Bopegamage S. Type I Diabetes Mellitus: Genetic Factors and Presumptive Enteroviral Etiology or Protection. J Pathog. 2014;

206. Sioofy-Khojine AB, Richardson SJ, Locke JM, Oikarinen S, Nurminen N, Laine AP, et al. Detection of enterovirus RNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with the presence of the predisposing allele of the type 1 diabetes risk gene IFIH1 and with disease stage. Diabetologia. 22 juill 2022;

207. Triolo TM, Fouts A, Pyle L, Yu L, Gottlieb PA, Steck AK, et al. Identical and Nonidentical Twins: Risk and Factors Involved in Development of Islet Autoimmunity and Type 1 Diabetes. Diabetes Care. févr 2019;42(2):192-9.

208. Gamble DR, Taylor KW. Seasonal Incidence of Diabetes Mellitus. Br Med J. 13 sept 1969;3(5671):631-3.

209. Hyöty H, Leon F, Knip M. Developing a vaccine for type 1 diabetes by targeting coxsackievirus B. Expert Review of Vaccines. 2 déc 2018;17(12):1071-83.

210. Blanter M, Sork H, Tuomela S, Flodström-Tullberg M. Genetic and Environmental Interaction in Type 1 Diabetes: a Relationship Between Genetic Risk Alleles and Molecular Traits of Enterovirus Infection? Curr Diab Rep. 10 août 2019;19(9):82.

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

212. Dunne JL, Richardson SJ, Atkinson MA, Craig ME, Dahl-Jørgensen K, Flodström-Tullberg M, et al. Rationale for enteroviral vaccination and antiviral therapies in human type 1 diabetes. Diabetologia. mai 2019;62(5):744-53.

213. Heim A. From poliovirus surveillance to enterovirus surveillance: a complete picture? J Med Microbiol. janv 2005;54(Pt 1):1-2.

214. Stone VM, Butrym M, Hankaniemi MM, Sioofy-Khojine AB, Hytönen VP, Hyöty H, et al. Coxsackievirus B Vaccines Prevent Infection-Accelerated Diabetes in NOD Mice and Have No Disease-Inducing Effect. Diabetes. déc 2021;70(12):2871-8.

215. Stone VM, Hankaniemi MM, Svedin E, Sioofy-Khojine A, Oikarinen S, Hyöty H, et al. A Coxsackievirus B vaccine protects against virus-induced diabetes in an experimental mouse model of type 1 diabetes. Diabetologia. févr 2018;61(2):476-81.

216. the TEDDY Study Group, Vehik K, Lynch KF, Wong MC, Tian X, Ross MC, et al. Prospective virome analyses in young children at increased genetic risk for type 1 diabetes. Nat Med. déc 2019;25(12):1865-72.

217. Rewers M, Hyöty H, Lernmark Å, Hagopian W, She JX, Schatz D, et al. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study: 2018 Update. Curr Diab Rep. 23 oct 2018;18(12):136.

218. Mattila M, Niinistö S, Takkinen HM, Tapanainen H, Reinivuo H, Åkerlund M, et al. Maternal Nitrate and Nitrite Intakes during Pregnancy and Risk of Islet Autoimmunity and Type 1 Diabetes: The DIPP Cohort Study. J Nutr. 19 nov 2020;150(11):2969-76.

219. Hyöty H. Viruses in type 1 diabetes. Pediatric Diabetes. 2016;17(S22):56-64.

220. Honkimaa A, Sioofy-Khojine AB, Oikarinen S, Bertin A, Hober D, Hyöty H. Eradication of persistent coxsackievirus B infection from a pancreatic cell line with clinically used antiviral drugs. J Clin Virol. juill 2020;128:104334.

221. 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. Journal of Virology. 1 janv 2010;84(1):254-60.

222. Antoniak S, Owens AP, Baunacke M, Williams JC, Lee RD, Weithäuser A, et al. PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection. J Clin Invest. 1 mars 2013;123(3):1310-22.

223. Rasti M, Khanbabaei H, Teimoori A. An update on enterovirus 71 infection and interferon type I response. Rev Med Virol. janv 2019;29(1):e2016.

224. Marttila J, Juhela S, Vaarala O, Hyöty H, Roivainen M, Hinkkanen A, et al. Responses of coxsackievirus B4-specific T-cell lines to 2C protein-characterization of epitopes with special reference to the GAD65 homology region. Virology. 25 mai 2001;284(1):131-41.

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

226. Ullmer W, Semler BL. Diverse Strategies Used by Picornaviruses to Escape Host RNA Decay Pathways. 2016.

227. Lei X, Xiao X, Wang J. Innate Immunity Evasion by Enteroviruses: Insights into Virus-Host Interaction. Viruses. 15 janv 2016;8(1):E22.

228. Jin Y, Zhang R, Wu W, Duan G. Innate Immunity Evasion by Enteroviruses Linked to Epidemic Hand-Foot-Mouth Disease. Frontiers in Microbiology [Internet]. 8 oct 2018 [cité 5 mars 2019];9. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02422/full

229. Pathinayake PS, Hsu ACY, Wark PAB. Innate Immunity and Immune Evasion by Enterovirus 71. Viruses. 2015;7:6613-30.

230. Richer MJ, Horwitz MS. The innate immune response: an important partner in shaping coxsackievirus-mediated autoimmunity. J Innate Immun. 2009;1(5):421-34.

231. Rui Y, Su J, Wang H, Chang J, Wang S, Zheng W, et al. Disruption of MDA5-Mediated Innate Immune Responses by the 3C Proteins of Coxsackievirus A16,

Coxsackievirus A6, and Enterovirus D68. Pfeiffer JK, éditeur. Journal of Virology [Internet]. 1 juill 2017 [cité 15 janv 2019];91(13). Disponible sur: http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00546-17

232. Goulet ML, Olagnier D, Xu Z, Paz S, Belgnaoui SM, Lafferty EI, et al. Systems Analysis of a RIG-I Agonist Inducing Broad Spectrum Inhibition of Virus Infectivity. Sen GC, éditeur. PLoS Pathogens. 25 avr 2013;9(4):e1003298.

233. Loo YM, Gale M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. Immunity. mai 2011;34(5):680-92.

234. Whitton JL, Feuer R. Myocarditis, Microbes and Autoimmunity. Autoimmunity. août 2004;37(5):375-86.

235. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. Ann N Y Acad Sci. nov 2008;1143:1-20.

236. Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in Host Defense: Natural Insights from Evolutionary, Epidemiological, and Clinical Genetics. Annu Rev Immunol. 23 avr 2011;29(1):447-91.

237. Sesti-Costa R, Françozo MCS, Silva GK, Proenca-Modena JL, Silva JS. TLR3 is required for survival following Coxsackievirus B3 infection by driving T lymphocyte activation and polarization: The role of dendritic cells. PLoS ONE. 2017;12(10):e0185819.

238. Mukherjee A, Morosky SA, Delorme-Axford E, Dybdahl-Sissoko N, Oberste MS, Wang T, et al. The Coxsackievirus B 3Cpro Protease Cleaves MAVS and TRIF to Attenuate Host Type I Interferon and Apoptotic Signaling. Heise M, éditeur. PLoS Pathogens. 10 mars 2011;7(3):e1001311.

239. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. Nat Rev Immunol. sept 2020;20(9):537-51.

240. Pagliuso A, Tham TN, Allemand E, Robertin S, Dupuy B, Bertrand Q, et al. An RNA-Binding Protein Secreted by a Bacterial Pathogen Modulates RIG-I Signaling. Cell Host Microbe. 11 déc 2019;26(6):823-835.e11.

241. Vabret N, Najburg V, Solovyov A, Gopal R, McClain C, Šulc P, et al. Y RNAs are conserved endogenous RIG-I ligands across RNA virus infection and are targeted by HIV-1. iScience. 15 juill 2022;25(7):104599.

242. Chazal M, Beauclair G, Gracias S, Najburg V, Simon-Lorière E, Tangy F, et al. RIG-I Recognizes the 5’ Region of Dengue and Zika Virus Genomes. Cell Rep. 10 juill 2018;24(2):320-8.

243. McKnight KL, Swanson KV, Austgen K, Richards C, Mitchell JK, McGivern DR, et al. Stimulator of interferon genes (STING) is an essential proviral host factor for human rhinovirus species A and C. Proc Natl Acad Sci U S A. 3 nov 2020;117(44):27598-607.

244. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. Nat Rev Immunol. févr 2015;15(2):87-103.

245. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. Nat Rev Drug Discov. déc 2007;6(12):975-90.

246. Perng YC, Lenschow DJ. ISG15 in antiviral immunity and beyond. Nat Rev Microbiol. juill 2018;16(7):423-39.

247. Mesev EV, LeDesma RA, Ploss A. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. Nat Microbiol. juin 2019;4(6):914-24.

248. Lee AJ, Ashkar AA. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. Front Immunol. 11 sept 2018;9:2061.

249. Lopacinski AB, Sweatt AJ, Smolko CM, Gray-Gaillard E, Borgman CA, Shah M, et al. Modeling the complete kinetics of coxsackievirus B3 reveals human determinants of host-cell feedback. Cell Syst. 21 avr 2021;12(4):304-323.e13.

250. 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. 29 nov 2012;2(5):1187-96.

251. Feng Q, Langereis MA, Olagnier 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. Thiel V, éditeur. PLoS ONE. 23 avr 2014;9(4):e95927.

252. Zhu Z, Wang G, Yang F, Cao W, Mao R, Du X, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Viroporin 2B Antagonizes RIG-I-Mediated Antiviral Effects by Inhibition of Its Protein Expression. J Virol. 2016;90:11106-21.

253. Zhang R, Cheng M, Liu B, Yuan M, Chen D, Wang Y, et al. DEAD-Box Helicase DDX6 Facilitated RIG-I-Mediated Type-I Interferon Response to EV71 Infection. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:725392.

254. Xiao H, Li J, Yang X, Li Z, Wang Y, Rui Y, et al. Ectopic Expression of TRIM25 Restores RIG-I Expression and IFN Production Reduced by Multiple Enteroviruses 3Cpro. Virol Sin. déc 2021;36(6):1363-74.

255. Barral PM, Morrison JM, Drahos J, Gupta P, Sarkar D, Fisher PB, et al. MDA-5 Is Cleaved in Poliovirus-Infected Cells. Journal of Virology. 15 avr 2007;81(8):3677-84.

256. Sanchez David RY, Combredet C, Najburg V, Millot GA, Beauclair G, Schwikowski B, et al. LGP2 binds to PACT to regulate RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Sci Signal. 1 oct 2019;12(601):eaar3993.

257. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, et al. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 26 janv 2010;107(4):1512-7.

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

259. Liu H, Li M, Song Y, Xu W. TRIM21 Restricts Coxsackievirus B3 Replication, Cardiac and Pancreatic Injury via Interacting With MAVS and Positively Regulating IRF3-Mediated Type-I Interferon Production. Front Immunol [Internet]. 25 oct 2018 [cité 3 avr 2020];9. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6209670/

260. Tatsumi K, Schmedes CM, Houston ER, Butler E, Mackman N, Antoniak S. Protease-activated receptor 4 protects mice from Coxsackievirus B3 and H1N1 influenza A virus infection. Cellular Immunology. 3 juill 2019;103949.

261. Buskiewicz IA, Koenig A, Roberts B, Russell J, Shi C, Lee SH, et al. c-FLIP-Short Reduces Type I Interferon Production and Increases Viremia with Coxsackievirus B3. PLoS One [Internet]. 9 mai 2014 [cité 3 avr 2020];9(5). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4015977/

262. Kimura T, Flynn CT, Alirezaei M, Sen GC, Whitton JL. Biphasic and cardiomyocyte-specific IFIT activity protects cardiomyocytes from enteroviral infection. PLOS Pathogens. 8 avr 2019;15(4):e1007674.

263. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. Semin Immunopathol. juill 2017;39(5):517-28.

264. Schulte BM, Kramer M, Ansems M, Lanke KHW, van Doremalen N, Piganelli JD, et al. Phagocytosis of Enterovirus-Infected Pancreatic -Cells Triggers Innate Immune Responses in Human Dendritic Cells. Diabetes. 1 mai 2010;59(5):1182-91.

265. Christen U. Enterovirus infection of human beta-cells activates dendritic cells and triggers innate antiviral responses: are enteroviruses convicted now? Diabetes. mai 2010;59(5):1126-8.

266. Wu F, Fan X, Yue Y, Xiong S, Dong C. A vesicular stomatitis virus-based mucosal vaccine promotes dendritic cell maturation and elicits preferable immune response against coxsackievirus B3 induced viral myocarditis. Vaccine. 30 juin 2014;32(31):3917-26.

267. Härkönen T, Paananen A, Lankinen H, Hovi T, Vaarala O, Roivainen M. Enterovirus infection may induce humoral immune response reacting with islet cell autoantigens in humans. J Med Virol. mars 2003;69(3):426-40.

268. Colomer-Lluch M, Ruiz A, Moris A, Prado JG. Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. Front Immunol. 2018;9:2876.

269. Wang H, Zhong M, Li Y, Li K, Wu S, Guo T, et al. APOBEC3G is a restriction factor of EV71 and mediator of IMB-Z antiviral activity. Antiviral Res. mai 2019;165:23-33.

270. Stenglein MD, Burns MB, Li M, Lengyel J, Harris RS. APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. Nat Struct Mol Biol. févr 2010;17(2):222-9.

271. Petit V, Guétard D, Renard M, Keriel A, Sitbon M, Wain-Hobson S, et al. Murine APOBEC1 is a powerful mutator of retroviral and cellular RNA in vitro and in vivo. J Mol Biol. 9 janv 2009;385(1):65-78.

272. Vartanian JP, Henry M, Marchio A, Suspène R, Aynaud MM, Guétard D, et al. Massive APOBEC3 Editing of Hepatitis B Viral DNA in Cirrhosis. Ou J hsiung J, éditeur. PLoS Pathog. 27 mai 2010;6(5):e1000928.

273. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. Trends Biochem Sci. juill 2016;41(7):578-94.

274. Ganser-Pornillos BK, Pornillos O. Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. Nat Rev Microbiol. sept 2019;17(9):546-56.

275. Zhang Y, Li J, Li Q. Immune Evasion of Enteroviruses Under Innate Immune Monitoring. Frontiers in Microbiology [Internet]. 2018 [cité 8 sept 2022];9. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01866

276. Feng Q, Langereis MA, Lork M, Nguyen M, Hato SV, Lanke K, et al. Enterovirus 2Apro Targets MDA5 and MAVS in Infected Cells. Journal of Virology. 15 mars 2014;88(6):3369-78.

277. Lei X, Sun Z, Liu X, Jin Q, He B, Wang J. Cleavage of the Adaptor Protein TRIF by Enterovirus 71 3C Inhibits Antiviral Responses Mediated by Toll-Like Receptor 3 ▿ . J Virol. sept 2011;85(17):8811-8.

278. Hung HC, Wang HC, Shih SR, Teng IF, Tseng CP, Hsu JTA. Synergistic inhibition of enterovirus 71 replication by interferon and rupintrivir. J Infect Dis. 15 juin 2011;203(12):1784-90.

279. Zheng Z, Li H, Zhang Z, Meng J, Mao D, Bai B, et al. Enterovirus 71 2C Protein Inhibits TNF-α–Mediated Activation of NF-κB by Suppressing IκB Kinase β Phosphorylation. The Journal of Immunology. 1 sept 2011;187(5):2202-12.

280. Du H, Yin P, Yang X, Zhang L, Jin Q, Zhu G. Enterovirus 71 2C Protein Inhibits NF-κB Activation by Binding to RelA(p65). Sci Rep. 23 sept 2015;5(1):14302.

281. Lei X, Han N, Xiao X, Jin Q, He B, Wang J. Enterovirus 71 3C Inhibits Cytokine Expression through Cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 Complex. J Virol. sept 2014;88(17):9830-41.

282. Lu J, Yi L, Zhao J, Yu J, Chen Y, Lin MC, et al. Enterovirus 71 disrupts interferon signaling by reducing the level of interferon receptor 1. J Virol. avr 2012;86(7):3767-76.

283. Fung G, Ng CS, Zhang J, Shi J, Wong J, Piesik P, et al. Production of a dominant-negative fragment due to G3BP1 cleavage contributes to the disruption of mitochondria-associated protective stress granules during CVB3 infection. PLoS One. 2013;8(11):e79546.

284. Ho BC, Yu IS, Lu LF, Rudensky A, Chen HY, Tsai CW, et al. Inhibition of miR-146a prevents enterovirus-induced death by restoring the production of type I interferon. Nat Commun. 2014;5:3344.

285. Xu C, He X, Zheng Z, Zhang Z, Wei C, Guan K, et al. Downregulation of MicroRNA miR-526a by Enterovirus Inhibits RIG-I-Dependent Innate Immune Response. J Virol. oct 2014;88(19):11356-68.

286. Lyles DS. Cytopathogenesis and Inhibition of Host Gene Expression by RNA Viruses. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1 déc 2000;64(4):709-24.

287. Lloyd RE. Nuclear proteins hijacked by mammalian cytoplasmic plus strand RNA viruses. Virology. 2015;479–480:457-74.

288. Peischard S, Ho HT, Theiss C, Strutz-Seebohm N, Seebohm G. A Kidnapping Story: How Coxsackievirus B3 and Its Host Cell Interact. Cell Physiol Biochem. 2019;53(1):121-40.

289. Kempf BJ, Barton DJ. Poliovirus 2A(Pro) increases viral mRNA and polysome stability coordinately in time with cleavage of eIF4G. J Virol. juin 2008;82(12):5847-59.

290. Joachims M, Van Breugel PC, Lloyd RE. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. J Virol. janv 1999;73(1):718-27.

291. Clark ME, Lieberman PM, Berk AJ, Dasgupta A. Direct cleavage of human TATA-binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro. Mol Cell Biol. févr 1993;13(2):1232-7.

292. Kundu P, Raychaudhuri S, Tsai W, Dasgupta A. Shutoff of RNA polymerase II transcription by poliovirus involves 3C protease-mediated cleavage of the TATA-binding protein at an alternative site: incomplete shutoff of transcription interferes with efficient viral replication. J Virol. août 2005;79(15):9702-13.

293. Lei X, Xiao X, Xue Q, Jin Q, He B, Wang J. Cleavage of interferon regulatory factor 7 by enterovirus 71 3C suppresses cellular responses. J Virol. févr 2013;87(3):1690-8.

294. Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, Bárcena M. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. Trends Microbiol. déc 2020;28(12):1022-33.

295. Barral PM, Sarkar D, Fisher PB, Racaniello VR. RIG-I is cleaved during picornavirus infection. Virology. 1 sept 2009;391(2):171-6.

296. Ruohtula T, Kondrashova A, Lehtonen J, Oikarinen S, Hämäläinen AM, Niemelä O, et al. Immunomodulatory Effects of Rhinovirus and Enterovirus Infections During the First Year of Life. Front Immunol. 2020;11:567046.

297. Chen B, Wang Y, Pei X, Wang S, Zhang H, Peng Y. Cellular Caspase-3 Contributes to EV-A71 2Apro-Mediated Down-Regulation of IFNAR1 at the Translation Level. Virol Sin. févr 2020;35(1):64-72.

298. Chase AJ, Semler BL. Viral subversion of host functions for picornavirus translation and RNA replication. Future Virol. févr 2012;7(2):179-91.

299. Lloyd RE. Enterovirus Control of Translation and RNA Granule Stress Responses. Viruses. 30 mars 2016;8(4):93.

300. Chen J, Yang F, Shi S, Liu X, Qin F, Wei X, et al. The Severity of CVB3-Induced Myocarditis Can Be Improved by Blocking the Orchestration of NLRP3 and Th17 in Balb/c Mice. Mediators Inflamm. 2021;2021:5551578.

301. Wang C, Fung G, Deng H, Jagdeo J, Mohamud Y, Xue YC, et al. NLRP3 deficiency exacerbates enterovirus infection in mice. FASEB J. janv 2019;33(1):942-52.

302. Wang H, Lei X, Xiao X, Yang C, Lu W, Huang Z, et al. Reciprocal Regulation between Enterovirus 71 and the NLRP3 Inflammasome. Cell Rep. 7 juill 2015;12(1):42-8.

303. Engelmann I, Alidjinou EK, Bertin A, Sane F, Hober D. miRNAs in enterovirus infection. Crit Rev Microbiol. nov 2018;44(6):701-14.

304. Simpson KE, Cunningham MW, Lee CK, Ward K, Tong A, Danon S, et al. Autoimmunity Against the Heart and Cardiac Myosin in Children With Myocarditis. J Card Fail. juill 2016;22(7):520-8.

305. Yuan HT, Liao YH, Wang Z, Dong JH, Cao LS, Wang ZH, et al. Prevention of myosin-induced autoimmune myocarditis in mice by anti-L3T4 monoclonal antibody. Can J Physiol Pharmacol. févr 2003;81(2):84-8.

306. Smatti MK, Cyprian FS, Nasrallah GK, Al Thani AA, Almishal RO, Yassine HM. Viruses and Autoimmunity: A Review on the Potential Interaction and Molecular Mechanisms. Viruses. 19 août 2019;11(8):762.

307. Schwimmbeck PL, Rohn G, Wrusch A, Schulze K, Doerner A, Kuehl U, et al. Enteroviral and immune mediated myocarditis in SCID mice. Herz. mai 2000;25(3):240-4.

308. Bracamonte-Baran W, Čiháková D. Cardiac Autoimmunity: Myocarditis. Adv Exp Med Biol. 2017;1003:187-221.

309. Rose NR. Viral damage or 'molecular mimicry'—placing the blame in myocarditis. Nat Med. juin 2000;6(6):631-2.

310. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. Clin Microbiol Rev. janv 2006;19(1):80-94.

311. Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Neu N, Wolfgram LJ, Alvarez FL, et al. Cardiac myosin and autoimmune myocarditis. Ciba Found Symp. 1987;129:3-24.

312. Neu N, Craig SW, Rose NR, Alvarez F, Beisel KW. Coxsackievirus induced myocarditis in mice: cardiac myosin autoantibodies do not cross-react with the virus. Clin Exp Immunol. sept 1987;69(3):566-74.

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

314. Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. Clin Exp Immunol. avr 2012;168(1):12-23.

315. Sane F, Bertin A, Sioofy-Khojine AB, Oikarinen S, Alidjinou EK, Veijola R, et al. Enhancing and neutralizing anti-coxsackievirus activities in serum samples from patients prior to development of type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. sept 2020;36(6):e3305.

316. Lönnrot M, Hyöty H, Knip M, Roivainen M, Kulmala P, Leinikki P, et al. Antibody cross-reactivity induced by the homologous regions in glutamic acid decarboxylase (GAD65) and 2C protein of coxsackievirus B4. Childhood Diabetes in Finland Study Group. Clin Exp Immunol. juin 1996;104(3):398-405.

317. Vreugdenhil GR, Geluk A, Ottenhoff TH, Melchers WJ, Roep BO, Galama JM. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. Diabetologia. janv 1998;41(1):40-6.

318. Härkönen T, Lankinen H, Davydova B, Hovi T, Roivainen M. Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. J Med Virol. mars 2002;66(3):340-50.

319. Huber S. T cells in coxsackievirus-induced myocarditis. Viral Immunol. 2004;17(2):152-64.

320. Tracy S, Drescher KM. Coxsackievirus Infections and NOD Mice: Relevant Models of Protection from, and Induction of, Type 1 Diabetes. Annals of the New York Academy of Sciences. 21 mars 2007;1103(1):143-51.

321. Escarmís C, Dopazo J, Dávila M, Palma EL, Domingo E. Large deletions in the 5′-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. Virus Research. 1 févr 1995;35(2):155-67.

322. Zani L, Forth JH, Forth L, Nurmoja I, Leidenberger S, Henke J, et al. Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. Sci Rep. 25 avr 2018;8:6510.

323. Cahour A, Pletnev A, Vazielle-Falcoz M, Rosen L, Lai CJ. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. Virology. 20 févr 1995;207(1):68-76.

324. Cheroni C, Donnici L, Aghemo A, Balistreri F, Bianco A, Zanoni V, et al. Hepatitis C Virus Deletion Mutants Are Found in Individuals Chronically Infected with Genotype 1 Hepatitis C Virus in Association with Age, High Viral Load and Liver Inflammatory Activity. PLoS One [Internet]. 25 sept 2015 [cité 30 janv 2020];10(9). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4583497/

325. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Immunohistochemical analysis of the relationship between islet cell proliferation and the production of the enteroviral capsid protein, VP1, in the islets of patients with recent-onset type 1 diabetes. Diabetologia. sept 2011;54(9):2417-20.

326. Lévêque N, Garcia M, Bouin A, Nguyen JHC, Tran GP, Andreoletti L, et al. Functional Consequences of RNA 5′-Terminal Deletions on Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. Pfeiffer JK, éditeur. J Virol. 15 août 2017;91(16):e00423-17, /jvi/91/16/e00423-17.atom.

327. Brunner JE, Ertel KJ, Rozovics JM, Semler BL. Delayed kinetics of poliovirus RNA synthesis in a human cell line with reduced levels of hnRNP C proteins. Virology. mai 2010;400(2):240-7.

328. Jaramillo L, Smithee S, Tracy S, Chapman NM. Domain I of the 5′ non-translated genomic region in coxsackievirus B3 RNA is not required for productive replication. Virology. 1 sept 2016;496:127-30.

329. Xiong D, Yajima T, Lim BK, Stenbit A, Dublin A, Dalton ND, et al. Inducible cardiac-restricted expression of enteroviral protease 2A is sufficient to induce dilated cardiomyopathy. Circulation. 2 janv 2007;115(1):94-102.

330. Manzoni TB, López CB. Defective (interfering) viral genomes re-explored: impact on antiviral immunity and virus persistence. Future Virol. 2018;13:493-503.

331. Boersma S, Rabouw HH, Bruurs LJM, Pavlovič T, van Vliet ALW, Beumer J, et al. Translation and Replication Dynamics of Single RNA Viruses. Cell. 23 déc 2020;183(7):1930-1945.e23.

332. Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. Front Immunol. 2014;5:342.

333. Hyde JL, Gardner CL, Kimura T, White JP, Liu G, Trobaugh DW, et al. A viral RNA structural element alters host recognition of nonself RNA. Science. 14 févr 2014;343(6172):783-7.

334. Kühl U, Pauschinger M, Poller W, Schultheiss HP. Anti-viral treatment in patients with virus-induced cardiomyopathy. Ernst Schering Res Found Workshop. 2006;(55):323-42.

335. Kühl U, Lassner D, von Schlippenbach J, Poller W, Schultheiss HP. Interferon-Beta Improves Survival in Enterovirus-Associated Cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology. 2 oct 2012;60(14):1295-6.

336. Lassner D, Siegismund CS, Kühl U, Rohde M, Stroux A, Escher F, et al. CCR5del32 genotype in human enteroviral cardiomyopathy leads to spontaneous virus clearance and improved outcome compared to wildtype CCR5. Journal of Translational Medicine [Internet]. déc 2018 [cité 5 mars 2019];16(1). Disponible sur: https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-018-1610-8

337. Aynaud MM, Suspène R, Vidalain PO, Mussil B, Guétard D, Tangy F, et al. Human Tribbles 3 protects nuclear DNA from cytidine deamination by APOBEC3A. J Biol Chem. 9 nov 2012;287(46):39182-92.

338. Caval V, Bouzidi MS, Suspène R, Laude H, Dumargne MC, Bashamboo A, et al. Molecular basis of the attenuated phenotype of human APOBEC3B DNA mutator enzyme. Nucleic Acids Res. 30 oct 2015;43(19):9340-9.

339. Breuer TGK, Menge BA, Banasch M, Uhl W, Tannapfel A, Schmidt WE, et al. Proinsulin levels in patients with pancreatic diabetes are associated with functional changes in insulin secretion rather than pancreatic beta-cell area. Eur J Endocrinol. oct 2010;163(4):551-8.

340. Ng CT, Oldstone MBA. IL-10: Achieving Balance During Persistent Viral Infection. In: Fillatreau S, O'Garra A, éditeurs. Interleukin-10 in Health and Disease [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cité 21 mars 2020]. p. 129-44. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 380). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-43492-5_6

341. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. J Interferon Cytokine Res. juin 2009;29(6):313-26.

ANNEXES

Annexe 1 : Master 1 Biologie – Santé – Qualité (Année 2015/2016, URCA)

Titre : Prévalence et détection quantitative des virus communs cardiotropes dans des prélèvements cardiaques autopsiques dans 34 cas de mort subite

Résumé : L'incidence de la mort subite cardiaque (MSC) est estimée entre 50 à 100 cas/100 000 habitants par an en Europe. Certains virus pourraient jouer un rôle étiologique ou de cofacteur dans le processus de MSC. Les objectifs de notre étude rétrospective étaient de déterminer la prévalence de détection de virus cardiotropes, les charges virales et de rechercher des mécanismes inflammatoires dans les cœurs de 34 sujets victimes de MSC et de 7 sujets témoins autopsiés à l'Institut Médico-légal du CHU de Reims entre 2009 et 2016. Les Entérovirus et virus herpétiques HHV-1 à HHV-8 ont été détectés par « RT-PCR macroarray » tandis que le Parvovirus B19 a été détecté par technique de RT-PCR spécifique. Des PCR quantitatives en temps réel ont été pratiquées en cas de positivité des tests qualitatifs. Dans le groupe MSC, l'âge moyen était de 34 ans [10–62] avec un rapport H/F = 21/13 et dans le groupe témoin (suicides ou accidents) l'âge moyen était de 35 ans [20–44] avec un rapport H/F = 5/2. La prévalence de détection de virus cardiotropes dans le groupe MSC était de 94% (32/34) alors qu'elle était de 100% (7/7) chez les témoins. Dans le groupe MSC, les virus les plus fréquents étaient le parvovirus B19 (PVB19) isolé (5 cas, 16%) ou associé à l'herpès virus de type VI (HHV-6) (10 cas, 31%), l'entérovirus (6 cas, 19%), et l'HHV-6 (5 cas, 16%). La prévalence d'infections par Entérovirus, EBV ou CMV (infection simple ou multiple) dans le groupe MSC était significativement plus élevée que dans le groupe témoin (37,5 vs 0 % *P=0,029 ; Test exact de Fisher*). Les médianes des charges virales étaient de 123 copies/µg pour le PVB19 et de 25 copies/µg pour HHV-6, compatibles avec des infections chroniques persistantes ou latentes et non significativement différentes entre les groupes MSC et témoin. Dans le groupe MSC avec détection virale positive, la présence d'une inflammation cardiaque (HLA-DR et/ou histologique) était plus fréquente dans les cas de MSC avec lésions cardiovasculaires sous-jacentes que dans les cas de MSC sans lésions cardiovasculaires sous-jacentes (62 vs 0 % *P=0,003, Test exact de Fisher*). L'analyse de l'expression des ARNm de 7 cytokines impliquées dans l'inflammation cardiaque a montré que l'IL-10 pourrait être impliquée dans le développement d'infections cardiaques chroniques à HHV-6 dans certains cas de MSC. La présence d'une inflammation cardiaque associée à une détection virale positive nous a permis de préciser le rôle étiologique potentiel de PVB19, HHV-6 et Entérovirus dans 15 (44%) des 34 cas de MSC étudiés. D'autres études sont nécessaires afin de préciser l'importance de ces virus dans les cas de MSC, ainsi que d'autres virus, et de déterminer si le dosage sanguin de l'IL-10 pourrait être un marqueur d'infection cardiaque chronique par des virus potentiellement responsables de MSC chez l'adulte jeune.

Mots-clés : Mort subite cardiaque, myocardites, virus, cytokines, inflammation

Annexe 2 : Master 2 Biologie – Santé : Microenvironnement cellulaire et pathologies (Année 2018/2019, URCA)

Titre : Impact des formes ARN virales tronquées en région 5'non codante sur la réponse interféron de type 1 dans un modèle murin de myocardite à virus Coxsackie-B3

Résumé : Des formes majoritaires d'Entérovirus B (EV-B) tronquées jusqu'à 50 nucléotides (nt) dans la région 5'Non-Codante (5'NC) et associées à des proportions minoritaires (5%) de formes complètes (FC) ont été caractérisées comme des populations virales persistantes dans les tissus cardiaques de patients souffrant de cardiomyopathie dilatée (CMD) (Bouin et al. Circulation 2019). En utilisant un modèle de myocardite induite par la souche cardiotrope CVB3/28 chez la souris DBA2/J, nous avons déterminé la dynamique d'émergence des populations virales tronquées en 5'NC dans les tissus cardiaques et nous avons étudié le profil de la réponse intra-cardiaque de type interféron-β (IFN-β) au cours de la phase précoce de l'infection cardiaque aigue (J2-J7). Par une approche de RACE-PCR, nous avons mis en évidence l'apparition précoce de deux groupes de population virales ARN tronquées (à J7, de 8 à 36nt (27%), et de 37 à 50nt (68%)) associées à 5% de formes ARN virales complètes dans la phase précoce de la myocardite aigue (J2-J7) à CVB3/28 (68 vs. 27% ; p<10-3). Nos résultats montrent une activation de la réponse cytokinique Th-1 (MCP-1 (NI vs J3 : p<0,001 ; J7 : p<0,01) et TNF-α (NI vs J2 : p<0,05 ; J3 : p<0,001 ; J7 : p<0,01) et une absence d'induction de la voie des IFN de type 1 au cours de la phase aigüe de l'infection cardiaque virale par la souche CVB3/28. Au cours de cette phase aigüe, nos données montrent une corrélation positive (R^2=0,6453 ; p=0,002) entre la proportion de formes complètes et tronquées intermédiaires (Formes complètes et délétions de moins de 36nt) et les concentrations en IFN-β alors qu'une corrélation inverse a été observée entre les proportions de formes tronquées de 37 à 50 nucléotides et les concentrations en IFN-β (R^2=0,6453 ; p=0,002) dans les tissus cardiaques murins. La transfection d'ARN synthétiques des formes moléculaires tronquées en 5'NC ou complètes de CVB3 dans des cellules cardiaques primaires humaines (HCM) a permis de confirmer le rôle inverse des deux populations virales sur la voie des IFN de type I et d'identifier les séquences immunomodulatrices responsables de la synthèse de l'IFN-β comme étant les structures des tiges-boucles « b » et « c » de la structure en feuille de trèfle (positions nucléotidiques entre 15 et 50 dans la 5'NC). Au final, nos résultats indiquent que la dynamique de sélection de formes virales ARN tronquées de 15 à 50 nt de CVB3 peut significativement moduler les niveaux de sécrétion d'IFN de type I dans les tissus cardiaques, aboutissant à un potentiel mécanisme d'évasion du virus à la surveillance du système immunitaire inné et à la persistance du virus dans le cœur.

Mots-clés : Myocardite aiguë, Entérovirus, Délétions, Immunité innée, Interférons type 1

Annexe 3 : Late-Onset Giant Cell Myocarditis Due to Enterovirus During Treatment with Immune Checkpoint Inhibitors

JACC: CARDIOONCOLOGY VOL. 2, NO. 3, 2020
© 2020 THE AUTHORS. PUBLISHED BY ELSEVIER ON BEHALF OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY FOUNDATION. THIS IS AN OPEN ACCESS ARTICLE UNDER THE CC BY-NC-ND LICENSE (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

CLINICAL CASE CHALLENGES

Late-Onset Giant Cell Myocarditis Due to Enterovirus During Treatment With Immune Checkpoint Inhibitors

Mariana Mirabel, MD, PhD,[a,b] Domitille Callon, MD,[c,d] Patrick Bruneval, MD, PhD,[a,e] Anne-Laure Lebreil, MSci,[c] Elie Mousseaux, MD, PhD,[a,f] Stéphane Oudard, MD, PhD,[a,g] Jean-Sébastien Hulot, MD, PhD,[a,b,h] Laurent Andreoletti, MD, PhD[c,i]

Immune checkpoint inhibitor (ICI) therapy has significantly improved the prognosis of many advanced cancers. ICIs target cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4), programmed cell death-1 (PD-1), or programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) and increase the antitumor immune response. Several immune-related side effects, including colitis, pneumonitis, hepatitis, and thyroiditis, have been reported since the U.S. Food and Drug Administration approval of the first ICI, ipilimumab, in 2011 (1). Cardiovascular adverse effects such as myocarditis are uncommon, but bear high mortality rates of nearly 50% (2). ICI myocarditis typically occurs early, and potential factors associated with ICI myocarditis are combination therapy (e.g., nivolumab [anti-PD-1] and ipilimumab [anti-CTLA-4] therapy), presence of a thymoma, and diabetes (3,4). Acute myocarditis after a first course of combination ICI therapy was assessed through a detailed study of 2 clinical cases (5). In both patients, myocardial lymphocytic CD8 infiltrates were identified on autopsy with no clear evidence of acute viral infection. As far as the pathophysiology, the theory of a common antigen or high frequency of T-cell receptor sequences amongst the myocardium, skeletal muscle, and tumors has been suggested.

However, the clinical presentation of ICI myocarditis is heterogeneous, with preserved left ventricular ejection fraction in one-half of the cases, and high rates of conduction abnormalities and ventricular arrhythmias (3). ICI myocarditis can also occur late, although notably, there is limited information on late-onset myocarditis with long-term ICI therapy (2). We herein describe a case of late myocarditis in a patient on long-term ICI therapy.

CASE PRESENTATION

A 57-year-old male patient presented with myalgias and dyspnea after the 27th course of 2nd-line ICI monotherapy (Nivolumab [anti-PD-1] 3 mg/kg every 3 weeks) for metastatic renal cell carcinoma. The electrocardiogram showed sinus tachycardia, low QRS voltage, and T-wave inversion in the anterior leads with no ST-segment changes. Cardiac biomarkers were elevated (troponin I 4,700 ng/l, B-type natriuretic peptide 466 ng/l). Left heart catheterization revealed normal coronary arteries. Cardiac magnetic resonance

From the [a]Université de Paris, Paris Cardiovascular Research Center PARCC, INSERM, Paris, France; [b]Cardio-oncology unit, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; [c]Université de Reims Champagne Ardenne, Cardiovir EA-4684, Reims, France; [d]CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Pathology Department, Reims, France; [e]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, APHP Centre, Hôpital Européen Georges Pompidou, Pathology, Paris, France; [f]Cardiovascular imaging, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; [g]Medical Oncology, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; [h]Centre d'Investigations Cliniques CIC1418, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; and the [i]CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Virology Department, Reims, France. The authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

The authors attest they are in compliance with human studies committees and animal welfare regulations of the authors' institutions and Food and Drug Administration guidelines, including patient consent where appropriate. For more information, visit the *JACC: CardioOncology* author instructions page.

Manuscript received April 30, 2020; revised manuscript received May 29, 2020, accepted May 29, 2020.

ISSN 2666-0873 https://doi.org/10.1016/j.jaccao.2020.05.022

JACC: CARDIOONCOLOGY, VOL. 2, NO. 3, 2020
SEPTEMBER 2020:511–4

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

CTLA-4 = cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4

EMB = endomyocardial biopsy

EV = enterovirus

ICI = immune checkpoint inhibitors

LVEF = left ventricular ejection fraction

PD-1 = programmed cell death-1

PD-L1 = programmed cell death-ligand 1

demonstrated severe and diffuse myocardial edema (mean myocardial T_2 = 74 ms, normal values <55 ms [Figure 1], high T_1 values of 1,163 ms, high extravascular volume of 35.5%), and severe biventricular dysfunction (left ventricular ejection fraction [LVEF] 32%). A right ventricular endomyocardial biopsy (EMB) was performed and intravenous steroids (methylprednisolone 1 g/day) were started within 24 h of intensive care unit admission and continued for 3 days, then tapered to prednisone 2 mg/kg/day. Peak high-sensitivity troponin I was 5,800 ng/l on day 3 of his hospitalization.

Histopathological analysis of the EMB specimen showed intense myocardial inflammation comprised of numerous giant cells associated with many mononuclear cells, and prominent myocyte necrosis (Figure 1). Immunohistochemistry showed that the inflammatory cells were mainly CD68-positive giant cells and macrophages and CD8-positive T-lymphocytes, many of them exhibiting granzyme B, perforin, and TIA1 cytotoxicity markers. PD-L1 was expressed only by inflammatory cells and not by cardiomyocytes. CD4 and CD20 lymphocytes as well as NKp46-positive NK cells were poorly represented (not shown).

The patient's hemodynamics remained stable, without cardiogenic shock, and the LVEF improved gradually over 8 days in the intensive care unit. No sustained ventricular arrhythmias or high-degree conduction abnormalities were observed. The LVEF improved to 50% before discharge, although there was right ventricular impairment. The patient was discharged on oral heart failure medications (angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-blockers) and prednisone 1 mg/kg/day on day 13. Rechallenge with ICI therapy was deemed too high-risk at the time and was withheld after a multidisciplinary discussion. The patient had close follow-up in the cardio-oncology clinic, heart failure medications were titrated to maximum-tolerated doses, and steroids were subsequently tapered. An ambulatory 24-h Holter monitor showed no significant rhythm or conduction disorders.

To investigate the presence of viral markers of cardiac infection, frozen EMBs were sampled and analyzed at a quaternary university hospital laboratory (EA-4684, Cardiovir, Reims, France). Molecular assays for the detection of viral genomes were performed for enteroviruses (EVs), human herpesviruses (HHV1 to HHV8), and human parvovirus B19 (HPVB19). Only enterovirus RNA genomes were detected, and the RNA genome copy number was then estimated by a standardized RT-quantitative polymerase chain reaction assay. The mean EV-B viral load was 6000 genome copies/μg of total nucleic acid extracted, indicative of a moderate viral genomic replication load in the cardiac tissue. To differentiate between acute and persistent EV-B infection, we investigated the proportions and 5′ uncoding region sizes of EV-B populations using referenced molecular assays. Three EV-B populations were identified with a major proportion (45.6%) of full-length viral forms associated with 2 minor viral RNA populations, characterized by deletions ranging respectively from 8 to 36 (34.1%) and 37 to 50 nucleotides (20.3%) in the 5′ uncoding region. Sequencing of the viral protein 1 gene was performed and resulted in the genotypic identification of an original echovirus-19 strain (GenBank accession no. MN596948); nucleotide and amino acid sequences percent identities were 78.51% and 93.42%, respectively, with the echovirus-19 strain Burke (GenBank accession no. AY302544.1). Sequence identities between the EMB virus isolate and the prototype echovirus-19 strain Burke demonstrated a homologous serotype. Immunohistochemistry for viral protein 1 detection was performed on heart biopsies and showed foci of positive cardiomyocytes surrounded by inflammatory infiltrates, indicating endomyocardial viral protein synthesis activities.

Steroids were gradually tapered and discontinued at 3 months in light of the viral analysis. Cardiac magnetic resonance imaging showed at 6 weeks: 1) resolution of myocardial edema (average myocardial T_2 = 50 ms (Figure 1), T_1 values of 917 ms, and extravascular volume decreased to 29%); 2) recovery of LVEF to 68%; and 3) improvement of right ventricular function with an ejection fraction of 44% at 6 weeks to 51% at 6 months follow-up. The cancer had not progressed at 6 months follow-up, and the patient reported normal functional status. ICI therapy was not restarted at the time of last follow-up.

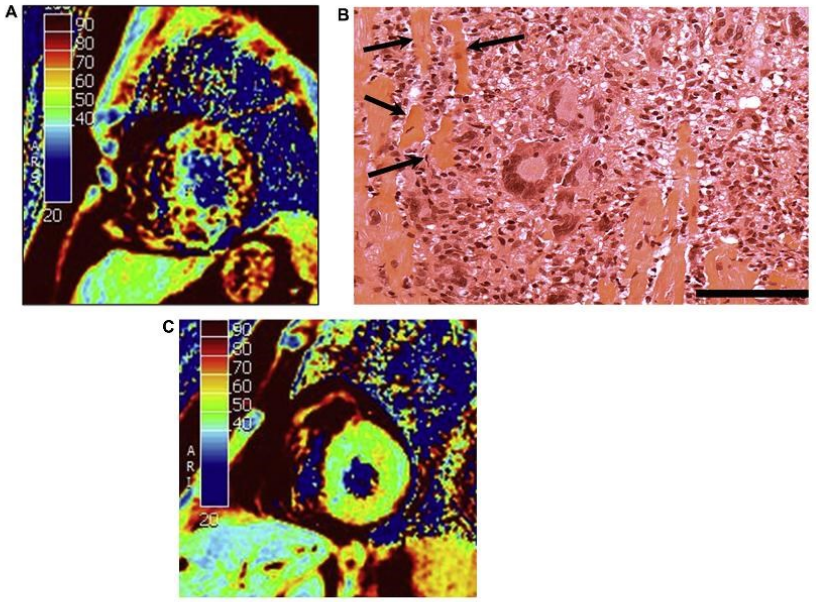
DISCUSSION

This case highlights the heterogeneity of pathogenesis of acute myocarditis on ICI therapy. We describe here acute myocarditis with long-term ICI therapy, secondary to giant cell myocarditis due to enterovirus.

Giant cell myocarditis is uncommon; its pathogenesis is poorly understood, and prognosis is poor. Recent data from an international registry including 220 patients with histologically proven severe myocarditis demonstrated that giant cell myocarditis bears the worst prognosis (6). The favorable outcomes in our patient,

JACC: CARDIOONCOLOGY, VOL. 2, NO. 3, 2020
SEPTEMBER 2020:511–4

FIGURE 1 CMR Imaging at Diagnosis, Endomyocardial Biopsy at Diagnosis, and CMR at Recovery (6-Week Follow-Up)



(A) Initial cardiac magnetic resonance (CMR) at 1.5-T, short axis; T_2 mapping. **(B)** Endomyocardial biopsy at high magnification showing extensive and complex inflammatory infiltrate made by many mononuclear cells, giant cells, and some polymorphonuclear cells. Inflammation was aggressive and associated with several necrotic cardiac myocytes **(arrows)**. Hematoxylin and eosin stain. Bar: 25 μm. **(C)** 6-week follow-up CMR at 1.5-T, short-axis; T_2 mapping.

in terms of biventricular systolic recovery and the absence of further relapse, are unexpected outcomes in this case of giant cell myocarditis. To the best of our knowledge, only 1 other case of giant cell myocarditis on ICI therapy has thus far been published. The context differed from our patient's given that the tumor was melanoma, the therapy was ipilimumab (targeting CTLA-4), and cardiovascular death was the outcome (7).

The moderate EV-B RNA load associated with major 5′ full-length viral populations supported the hypothesis of an opportunistic acute viral infection as the cause of the late-onset fulminant myocarditis in our patient. Endomyocardial inflammatory damage could result from EV-induced cytopathic effects and cellular autoimmune mechanisms. The presence of endomyocardial giant cells may have been related both to viral and ICI-induced autoimmune cellular dysfunctions, acting synergistically and resulting in myocarditis. As far as the pathophysiology, the PD-1/PD-L1 pathway plays a critical role in suppressing inflammation induced by viral infection, allograft transplantation, as well as autoimmune mechanism, protecting tissues from acute histopathological damage. Viruses, specifically EV-B, have developed various strategies to escape from innate immune responses including blockade of the PD-1/PD-L1 pathway. Indeed, cleavage activities of EV-B proteinases can down-regulate PD-L1 expression in cardiac cells in vivo and in vitro inducing severe inflammatory damage (8). Here, on EMB, PD-L1 was only expressed by inflammatory cells and not by cardiomyocytes. Total disruption of the PD-1/PD-L1 pathway both by EV-B infection and ICI in cardiac tissue might explain the clinical and histopathological severity of our case. We further hypothesized that ICI therapy cessation may have reestablished T-cell immunity, resulting in viral clearance and complete clinical and imaging recovery.

Although the number of patients eligible to ICI treatment is increasing dramatically, the pathogenesis of myocarditis needs to be further investigated. Based on only 2 extensively studied cases (5) and 2 retrospective cohorts limited to approximately 30 participants each (3,4), societies have released case definitions for these

emerging clinical syndromes (9). The American Heart Association (AHA) has recently proposed diagnostic criteria for ICI myocarditis diagnosis based mainly on clinical characteristics, abnormal biomarkers, and/or cardiac imaging abnormalities (9). The recent publication of ICI myocarditis definitions by the AHA has the value of standardizing criteria to improve reporting. Steroids are the first-line front treatment of ICI myocarditis, despite poor evidence to support this, followed by other immune modulators, plasma exchange, or even CTLA-4 agonist (abatacept) infusions. In the present study case, steroids were introduced and then discontinued after the confirmation of active viral markers on EMB. Indeed, the prognosis of T-cell ICI myocarditis is partly driven by early initiation of steroid treatment (10), which should not be held when awaiting histological or viral results.

Endomyocardial biopsy is recommended whenever possible in fulminant myocarditis (9). It is, however, likely to be overlooked in cancer patients. This case report emphasizes the risk for opportunistic viral infection during long-term ICI therapy and utility of biopsy. The first mechanism to be considered in the setting of ICI myocarditis is T-cell mediated, prompting steroids as a first-line therapy early after hospital admission. Endomyocardial biopsy should be performed whenever possible to rule out infectious causes of myocarditis to guide therapy and further our understanding of the potential varying presentations of ICI myocarditis.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE: Dr. Mariana Mirabel, Assistance Publique Hôpitaux de Paris-Centre University of Paris, Cardio-Oncology Unit, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc, 75737 Paris Cedex 15, France. E-mail: mariana.mirabel@aphp.fr. Twitter: @drmirabel.

REFERENCES

1. Wang DY, Salem J-E, Cohen JV, et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. JAMA Oncol 2018;4:1721.

2. Salem J-E, Manouchehri A, Moey M, et al. Cardiovascular toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: an observational, retrospective, pharmacovigilance study. Lancet Oncol 2018;19:1579–89.

3. Escudier M, Cautela J, Malissen N, et al. Clinical features, management, and outcomes of immune checkpoint inhibitor-related cardiotoxicity. Circulation 2017;136:2085–7.

4. Mahmood SS, Fradley MG, Cohen JV, et al. Myocarditis in patients treated with immune checkpoint inhibitors. J Am Coll Cardiol 2018;71:1755–64.

5. Johnson DB, Balko JM, Compton ML, et al. Fulminant myocarditis with combination immune checkpoint blockade. N Engl J Med 2016;375:1749–55.

6. Ammirati E, Veronese G, Brambatti M, et al. Fulminant versus acute nonfulminant myocarditis in patients with left ventricular systolic dysfunction. J Am Coll Cardiol 2019;74:299–311.

7. Reuben A, Petaccia M de M, McQuade J, et al. Comparative immunologic characterization of autoimmune giant cell myocarditis with ipilimumab. Oncoimmunology 2017;6:e1361097.

8. Wang T, Chen S, Wang X, et al. Aberrant PD-1 ligand expression contributes to the myocardial inflammatory injury caused by coxsackievirus B infection. Antiviral Res 2019;166:1–10.

9. Bonaca MP, Olenchock BA, Salem J-E, et al. Myocarditis in the setting of cancer therapeutics: proposed case definitions for emerging clinical syndromes in cardio-oncology. Circulation 2019;140:80–91.

10. Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ, et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with immune checkpoint inhibitor therapy: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. J Clin Oncol 2018;36:1714–68.

KEY WORDS enterovirus, giant cell myocarditis, imaging, immune checkpoint inhibitors, immunotherapy, myocarditis

Annexe 4 : Structures and Functions of Viral 5' Non-Coding Genomic RNA Domain-I in Group-B Enterovirus Infections

viruses

MDPI

Review

Structures and Functions of Viral 5′ Non-Coding Genomic RNA Domain-I in Group-B Enterovirus Infections

Marie Glenet [1,†], Laetitia Heng [1,†], Domitille Callon [1,2], Anne-Laure Lebreil [1], Paul-Antoine Gretteau [1], Yohan Nguyen [1,3], Fatma Berri [1] and Laurent Andreoletti [1,4,*]

1 EA-4684 CardioVir, Faculty of Medicine, University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), 51097 Reims, France; marie.glenet@gmail.com (M.G.); laetitia.heng@gmail.com (L.H.); domitille.callon@gmail.com (D.C.); anne-laure.lebreil@univ-reims.fr (A.-L.L.); gretteaupa@hotmail.fr (P.-A.G.); ynguyen@chu-reims.fr (Y.N.); fatma.berri@univ-reims.fr (F.B.)

2 Laboratoire de Biopathologie, Centre Hospitalier Universitaire Reims, 51097 Reims, France

3 Service de Médecine Interne, Immunologie clinique et maladies infectieuses, Centre Hospitalier Universitaire Reims, 51097 Reims, France

4 Laboratoire de Virologie Médicale et Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire Reims, 51097 Reims, France

* Correspondence: landreoletti@chu-reims.fr; Tel.: +33-3-26-78-77-02; Fax: +33-3-26-78-41-34

† These authors contributed equally to this work.

Received: 29 July 2020; Accepted: 19 August 2020; Published: 21 August 2020

check for updates

Abstract: Group-B enteroviruses (EV-B) are ubiquitous naked single-stranded positive RNA viral pathogens that are responsible for common acute or persistent human infections. Their genome is composed in the 5′ end by a non-coding region, which is crucial for the initiation of the viral replication and translation processes. RNA domain-I secondary structures can interact with viral or cellular proteins to form viral ribonucleoprotein (RNP) complexes regulating viral genomic replication, whereas RNA domains-II to -VII (internal ribosome entry site, IRES) are known to interact with cellular ribosomal subunits to initiate the viral translation process. Natural 5′ terminally deleted viral forms lacking some genomic RNA domain-I secondary structures have been described in EV-B induced murine or human infections. Recent in vitro studies have evidenced that the loss of some viral RNP complexes in the RNA domain-I can modulate the viral replication and infectivity levels in EV-B infections. Moreover, the disruption of secondary structures of RNA domain-I could impair viral RNA sensing by RIG-I (Retinoic acid inducible gene I) or MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) receptors, a way to overcome antiviral innate immune response. Overall, natural 5′ terminally deleted viral genomes resulting in the loss of various structures in the RNA domain-I could be major key players of host–cell interactions driving the development of acute or persistent EV-B infections.

Keywords: group-B enterovirus; RNA domain-I; viral ribonucleoprotein complexes; enterovirus replication; 5′ terminally deleted viral forms; antiviral innate immune response; type I interferon

1. Introduction

Group-B enteroviruses (EV-B) are common human pathogens responsible for a wide range of pathologies such as myocarditis, pancreatitis, hepatitis, or meningitis resulting from acute infections in children and young adults [1,2]. Some part of acute EV-B infections can evolve toward persistent infections responsible for chronic pathologies such as dilated cardiomyopathy (DCM), type 1 diabetes, and inflammatory myopathy [3–7].

EV-B belong to the *Picornaviridae* family [8] and the *Enterovirus* genus is composed of 15 species, classified according to their biological properties and phylogenetic analyses, seven of which are human viruses: EV-A to -D species and three rhinoviruses species (RV-A to -C) (Figure 1) [9–11]. EV-B are small naked single-stranded positive RNA viruses of approximately 7400 nucleotides (nt) [12]. Enteroviral genome is functionally divided in four parts (Figure 2A) with a 5′ non-coding region (5′ NCR), two open reading frames (one monocistronic coding region), and a 3′ non-coding region (3′ NCR) [13]. The 5′ NCR is crucial for the initiation of the replication and translation of the viral genome. This enteroviral 5′ NCR is about 750 nt in length and composed of two secondary structure complexes: the first one is involved in the replication of both viral positive- and negative-strands and is organized in one stem "a" and three stem-loops "b", "c", and "d" resulting in a 5′ end Cloverleaf-like structure commonly named viral RNA domain-I (Figure 2B). The second one is composed of six stem-loops (domains-II to -VII) forming an internal ribosome entry site (IRES) involved in cap-independent polyprotein translation.

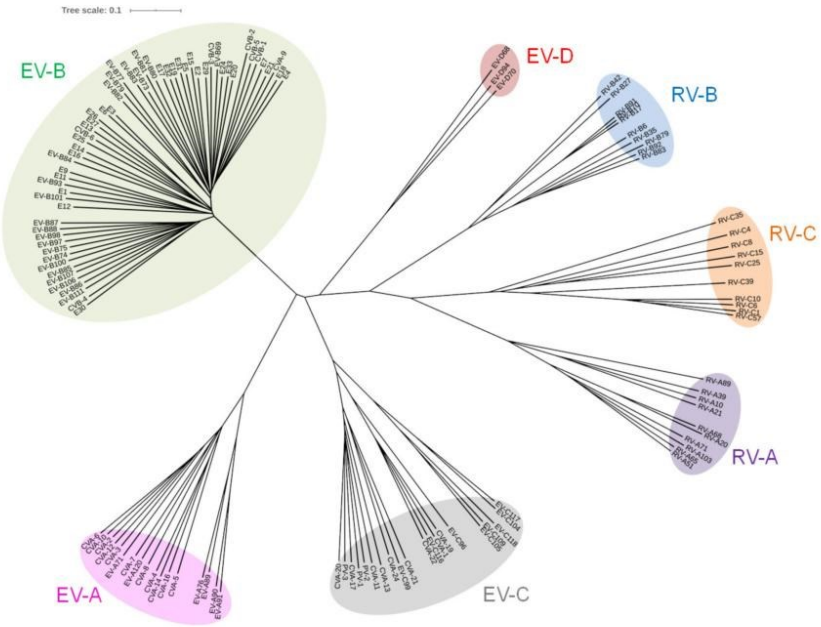


Figure 1. Evolutionary relationship of human enterovirus species. Molecular phylogenetic analysis of human enteroviruses was inferred using the Neighbor-Joining method (Letunic and Bork, 2019). Phylogenetic tree was constructed using complete sequence of enteroviruses aligned by muscle method. The optimal tree with the sum of branch length = 18.13314604 is shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 128 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There was a total of 8522 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar et al., 2018). EV-A: Enterovirus A; EV-B: Enterovirus B; EV-C: Enterovirus C; EV-D: Enterovirus D; RV-A: Rhinovirus A; RV-B: Rhinovirus B; RV-C: Rhinovirus C.

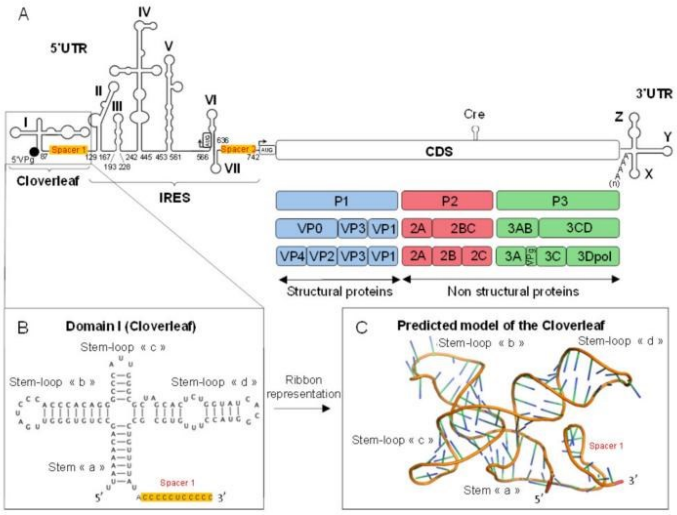


Figure 2. Group-B enterovirus genome organization. (**A**) Enterovirus-B viral genome is composed of two open reading frames (ORFs) which one is a polyprotein coding for capsidic (viral proteins 1 to 4) and non-structural viral proteins such as proteases 2A, 3C, and the 3D polymerase. This long ORF is flanked by two untranslated regions (UTRs): the 5′ UTR is composed of a Cloverleaf-like secondary structure (CL, stem-loop I) responsible for the viral genomic replication separated by a spacer sequence comprising two C-rich clusters from an Internal Ribosome Entry Site element type 1 (IRES, stem-loops II to VII) which has a role in the viral translation. Nucleotide numbers are indicated below the structures. (**B**,**C**) Schematic representation of the predicted 5′ end Cloverleaf secondary structures (CL, stem-loop I) of the enteroviral positive strand RNA. The CL is composed of a stem "a" (nucleotides 2–9 with nucleotides 80–87), stem-loop "b" (nucleotides 10–34), stem-loop "c" (nucleotides 35–45), and a stem-loop "d" (nucleotides 46–79).

The viral replication process is well-conserved among EV species [14]. Following the viral capsid attachment to various cellular co-receptors or receptors defining the cell tropism, the positive-strand RNA is released from the viral particle into endocytoplasmic vesicles [14]. The capsid-free viral positive single-stranded RNA is directly translated in a cap-independent mRNA structure according to the cellular ribosomes' recruitment to its large type 1 IRES (domains-II to -VII) into two open reading frames (ORFs). The viral polyprotein is then cis-cleaved by its autocatalytic 2A ($2A^{pro}$) and 3C proteases ($3C^{pro}$) into structural viral proteins 1–4 (VP1–4) and non-structural proteins including the RNA polymerase [15]. The single positive-stranded RNA replicates through a negative-strand intermediate. Generation of the negative-strand RNA is dependent on RNA sequences and secondary structure domain-I interacting with viral and cellular proteins to form viral ribonucleoprotein (RNP) complexes. Enteroviral genomic replication mechanisms result in the efficient synthesis of negative single-strand RNA used as a matrix to then generate positive single-strand RNA.

Enteroviral RNA genomes are known to mutate more easily than DNA viruses, thus leading to mutated and deleted forms of the viral RNA including the 5′-terminally deleted (5′ TD) viral genomes. Natural 5′ TD viral genomes resulting in the loss of different structures ranging from stem "a", to stem-loop "b" or "c" or part of stem-loop "d" in the 5′ terminal Cloverleaf RNA structure (domain-I) were described in in vitro and in vivo experimental models of EV-B infections. Recently, EV-B populations with 5′ terminal genomic RNA deletions (5′ TD) similar to those described in experimental models were associated with the development of myocarditis or DCM human cases [16,17]. These 5′ TD EV-B populations were characterized as low replicating RNA forms with viral-encoded proteinase

activities related with dystrophin cleavage in human cardiac tissues [16]. Through the transfection of synthetic 5′ TD EV-B RNA forms into murine and human cardiac cells, experimental in vitro results evidenced that the loss of some RNP units in viral RNA domain-I could modulate the viral replication and infectivity levels during early phases of EV-B target cell infections [18]. Altogether these results indicate that the loss of some secondary structures of RNA domain-I could significantly impair the viral genomic RNA replication activities resulting in a significant decrease of viral fitness and infectivity levels in target tissues [18].

Reported natural deletions within the 5′ NCR of EV-B forms are known to affect functional secondary-structural elements of the RNA domain-I (Cloverleaf-like structure) [18]. The loss of some secondary structures of RNA domain-I could impair the viral genomic RNA recognition by retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs: RIG-I and melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5) which are critical cellular sensors for innate immune defense against Picornaviruses [19,20]. To date, the specific contributions of RIG-I or MDA5 to the anti-EV-B innate immune response remain to be investigated in various infected cells. Through transfection of synthetic complete or various 5′ TD EV-B RNA forms into cultured human cardiac cells, it was demonstrated that natural deletions into the 5′ RNA domain-I of EV-B can modify the RNA secondary-structural elements recognized by cytoplasmic RLRs such as RIG-I or MDA5 and modulate type I interferon (IFN) activation pathway induction [17]. Interestingly, similar natural 5′ terminally deletions capable of modulating activation type I IFN response were characterized in patients with acute myocarditis. Overall, these findings evidenced that natural 5′ TD RNA forms in EV-B populations can modulate type I IFN induction, a way to overcome antiviral innate immune response and to promote persistent infection in EV-B human target tissues such as heart and pancreas.

The present article reviews the importance of secondary structural elements of 5′ terminal EV-B RNA domain-I for the formation of viral RNP complexes regulating viral genome replication and also for the activation of type I IFN signaling pathway by RLRs (RIG-I, MAD5) sensors. The present review deciphers functional consequences of the natural loss of some viral 5′ terminal RNA domain-I secondary structures on the viral RNA replication and on the type I IFN pathway activation in EV-B infected human cells. Overall, natural 5′ TD viral genomes resulting in the loss of different structures in the RNA domain-I could be major key players of host–cell interactions driving the development of acute or persistent infections in human target cells.

2. Functional Organization of 5′ Terminal EV-B RNA Secondary Structures

EV-B replication activities are dependent on the 5′ NCR of about 750 nt in length divided into two highly conserved and well-known structured functional regions. The first one is a ≈90 nt predicted Cloverleaf-like secondary structure also known as stem-loop-I (SL-I) or domain-I, which is crucial for the initiation of the genomic replication for both viral positive- and negative-strands RNA. Enteroviral RNA domain-I presents a conserved structural pattern among EV-B organized in one stem "a" and three stem-loops "b", "c", and "d" and commonly named Cloverleaf-like structure or RNA domain-I (Figure 2B,C). The second two-dimensional structured pattern from the 5′ NCR is composed of six stem-loops (SL II–VII) and is an IRES involved in the cap-independent viral polyprotein translation (Figure 2A) [21–24], the host range [25], the replication efficiency [26,27], the cell tropism, and the virulence [26,28,29]. Two regions of around 40 and 100 nt space, respectively, the Cloverleaf from IRES and then the IRES from the translation initiation codon into the VP4 coding sequence [30] (Figure 2A). Enteroviral genome has a principal ORF encoding a long and single monocistronic autocatalytic polyprotein of ≈250 kDa resulting in viral capsid proteins and non-structural proteins. Moreover, a second upstream ORF (uORF) of the principal has been recently identified and could encode for a protein promoting the viral growth in initial viral replication sites (human epithelial cells) and facilitating viral particle release [13,31]. These two ORFs are flanked by 5′ and 3′ NCRs, also called untranslated regions (UTR). The genomic RNA of picornaviruses is linked to a viral protein genome-linked (VPg) at its 5′ NCR, which acts as a primer during viral RNA synthesis [32–35]

3. Enteroviral 5′ Terminal Domain-I RNA Sequences Involved in Viral Genomic Replication Through the Formation of Viral Ribonucleoprotein Complexes

Enteroviral RNA secondary structure domain-I interacts with viral and cellular proteins to form viral RNP complexes mediating viral genome replication mechanisms in infected cells (Figure 3). The Cloverleaf structure, first described in polioviruses, is a cis-acting RNA replication element required for initiation of negative- and positive-strand synthesis [36–41].

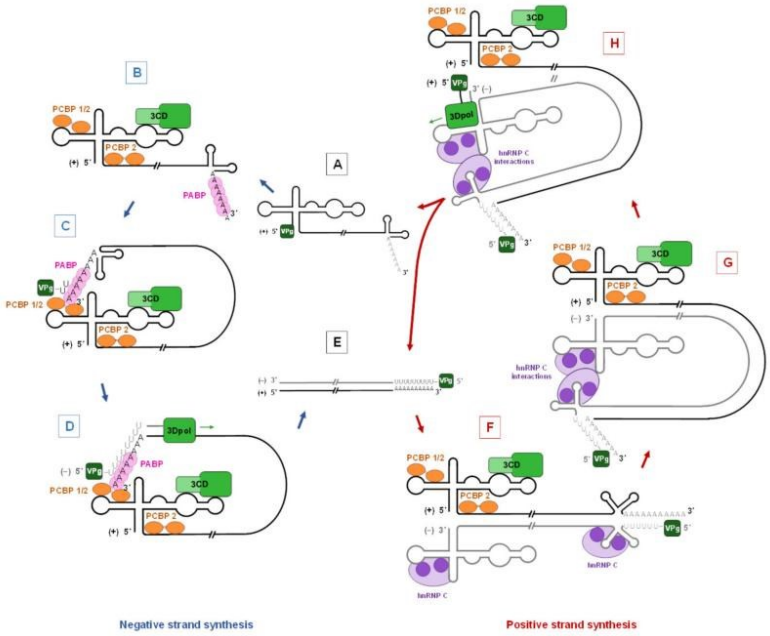


Figure 3. Viral ribonucleoprotein complexes involved in group-B enterovirus genomic replication process. (**A**) The enterovirus genome is single-stranded positive RNA with a 5′ non-coding region (5′ NCR) including a Cloverleaf-like structure (RNA domain-I). The genomic RNA is linked to a viral protein genome-linked (VPg) at its 5′-terminus, which acts as a primer during viral RNA synthesis. (**B**) Host cellular protein Poly(A) binding protein (PABP) interacts with the poly(A) tail in the viral genome 3′ end; Poly(C) Binding Protein (PCBP) 1/2 binds to the stem-loop "b" of the Cloverleaf and PCBP 2 binds to the spacer 1. Viral precursor protein 3CD interacts with stem-loop "d" of the Cloverleaf. (**C**) Through protein–protein interactions between PCBP 1/2 and PABP, the 5′ ends interact to form a ribonucleoprotein complex (RNP). The circularization of the viral RNA initiates the negative-strand synthesis. (**D**) The viral 3D polymerase synthesizes the negative strand. (**E**) The product of the negative-strand synthesis is a double-strand RNA complex called replication form. (**F**) Viral double-strand RNA complex unwinds at both ends, which enables the two Cloverleaf-like structures to interact with cellular and viral proteins. Nuclear protein, heterogeneous nuclear RNP-C (hnRNP-C), can interact with both ends of the negative-strand. Interactions of viral double-strand RNA complex with cellular and viral proteins allow maintaining a single-stranded structure at both ends of the replication form. (**G**) hnRNP-C could promote negative-strand circularization by oligomerization. (**H**) The circularization allows the initiation of the positive-strand synthesis. The 3D polymerase recruitment allows the start of positive-strand synthesis using VPg as primer. This process results in the formation of neo-synthetized positive- strands RNA and viral double-strand RNA complexes.

Following the attachment and the decapsidation phases of enteroviral cycle, the viral RNA of positive-polarity is directly translated into the cytoplasm and allows the synthesis of proteins necessary for its own genomic replication and the production of new virions. After translation of viral proteins, the first step of viral genome replication consists in the transcription of the positive-polarity RNA by 3D polymerase ($3D^{pol}$) into an RNA of negative polarity (also called antigenomic or replication intermediate), which will be used as a template for the synthesis of new viral RNA of positive-polarity that can be translated in turn (Figure 3).

Negative-strand RNA synthesis involves the formation of a functional RNP complex at the 5′ end of the viral genomic RNA. The host cellular poly(C) binding proteins 1 and 2 (PCBP1/2) and poly(A) binding proteins (PABP) are major key factors of the viral minus-strands RNA synthesis [36]. Briefly to construct this RNP, cellular cytoplasmic PCBP1/2 interact with the stem-loop "b" of the Cloverleaf structure whereas the viral 3CD proteinase ($3CD^{pro}$) interacts with the stem-loop "d", while PABP binds to the poly(A) located at the end of the 3′ UTR [42,43] (Figure 3B and Table 1). Moreover, PCBP2 interacts with the spacer 1 at the end of the Cloverleaf-like structure (Figure 3B). The binding of PABP to PCBP1/2 by protein–protein interactions allows viral RNA folding which results in the circularization of the genomic RNA promoting interactions between the 5′ and 3′ ends for picornaviruses negative-strand RNA synthesis [44] (Figure 3C). Moreover, the $3CD^{pro}$ interacts with the *cre*, which is a RNA stem-loop element in the 2C coding region [45,46]. This regulating RNA structure enhances $3D^{pol}$ uridylylation of the viral protein VPg [38,47], which then acts as a primer in negative- and positive-strand RNA synthesis initiation [45,48]. Following the construction of this viral RNP complex, $3D^{pol}$ exercises its RNA-dependent RNA polymerase activity using the uridylylated VPg as a primer of negative-strand RNA synthesis (Figure 3D). The negative-strand synthesis results in a double-strand RNA complex called replication form (Figure 3E). The protein components of the RNP and their roles fully depend on their binding and interaction sites (Figure 3B, Table 1). The preservation of the Cloverleaf, a cis-acting replication element at the 5′ end of the positive genomic RNA strand through strong selection pressure might be necessary to maintain the primary, secondary, or tertiary structures of this genomic region. Moreover, the existence of a conserved RNA structure has been hypothesized allowing for the replication complex to specifically recognize enteroviral genome RNA among cellular mRNAs [49].

Table 1. Cellular and viral factors involved in the formation of ribonucleoprotein complexes in group-B enterovirus genomic replication or translation process.

Cellular/Viral Factors		Binding Site in RNA Structure	Interaction Partner	Role in EV-B Replication Activities	References
PCBP 1	Poly(C) Binding Protein 1	SL-I "b" (Cloverleaf) and reduced affinity to SL-IV (IRES)	Viral 3C proteases ($3C^{pro}$) and $3CD^{pro}$	Initiation of the viral translation and RNA synthesis	[50–52]
PCBP 2	Poly(C) Binding Protein 2	SL-I "b", C-rich spacer) and SL-IV (IRES)	SRp20 (Serine/arginine-rich splicing factor), PCBP2 dimerization, viral $2A^{pro}$, $3C^{pro}$, and $3CD^{pro}$	Initiation of the viral translation and RNA synthesis. Switch from viral translation to viral genome replication	[50,52–60]
EF-1α	Eukaryotic elongation factor 1α	SL-I	Viral $3CD^{pro}$	Cofactor candidate of the enteroviral genome replication	[61]
La	Lupus autoantigen	Reduced affinity to SL-I, IRES, and 3′ UTR	La dimerization	5′ UTR-La/La-3′ UTR complex may form a replication loop and enhance viral replication initiation. Cofactor of the pre-translation initiation protein-RNA complex	[62,63]
hnRNP K	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	SL-I to II and SL-IV (IRES) and biotinylated EV71 5′ UTR	K Homology (KH) 2 domain, the proline-rich domain, and one neighboring KH domain (KH1 or KH3)	Inhibition of viral RNA synthesis	[64,65]
hnRNP A1 & A2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and A2	SL-II to II and SL-VI (IRES)	-	Activation of IRES activity/regulation of alternative splicing, and it antagonizes the activity of serine-arginine rich (SR) family proteins	[66–68]
hnRNP C	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	Positive-strand SL-V, negative-strand 5′ and SL-I "a" of 3′ ends	Viral P2 and P3 and $3D^{pol}$, $3CD^{pro}$	Enhance viral RNA synthesis. Stabilize and promote efficient positive-strand RNA synthesis	[69–71]
PABP	Poly(A) binding protein	SL-I "b" (Cloverleaf) and Poly(A) tail	PCBP2, $3C^{pro}$, and $3CD^{pro}$	Enhance IRES-mediated translation and RNA synthesis. Genome circularization for the initiation of negative strand RNA synthesis	[39,44,72]
3AB	Protein 3AB, precursor of viral proteins 3A and VPg (viral protein genome-linked)	SL-I "b" (Cloverleaf) complexed with $3CD^{pro}$	Viral protease 3C and 3CD in absence of RNA	Enhance IRES-mediated translation and RNA synthesis. Destabilize the secondary structures of RNA, enhance its hybridization in viral replication and $3D^{pol}$ stimulation	[73]

Table 1. *Cont.*

Cellular/Viral Factors		Binding Site in RNA Structure	Interaction Partner	Role in EV-B Replication Activities	References
$3CD^{pro}$	Proteinase 3CD, precursor of viral $3C^{pro}$ and $3D^{pol}$	SL-I "d" (Cloverleaf) and 3′ UTR and Cis acting replication element (cre)	3AB, PABP1/2, EF-1α, hnRNP C, PABP	Shut off of the cellular transcription, protease activity, circularization of the viral genome and complex formation for RNA replication	[36,74–82]
$3C^{pro}$	Proteinase 3C	SL-I "b" or "d" (Cloverleaf)	PABP, PCBP2	Cleavage of cellular proteins like translation initiation factor eIF4G and PABP leading to shut off of host translation + cleavage of hnRNP A1 leading to reduce inhibitor effect of hnRNP A1 on apoptosis + initiations of the viral translation and RNA synthesis	[36,56,80,82–88]
FBP1	Far-upstream element-binding protein 1	Only linker region (nt 637 to 745) of the EV71 5′ UTR	FUSE upstream of the c-*myc* gene and KH3 and KH4 motifs	Positive regulatory factor for IRES activity and enhance viral protein synthesis	[65,89]
FBP2	Far-upstream element-binding protein 2	SL I, II region, the SL II, III region, and SL V, VI and linker regions of EV71 5′ UTR	FUSE upstream of the c-*myc* gene and KH2 and KH4 motifs	Negative regulatory factor for IRES activity and inhibition of viral protein synthesis	[65,89]
$2A^{pro}$	Proteinase 2A	-	Cleave 3CD to produce 3C′ and 3D′ + VP1 and P2	Cleavage of cellular proteins like translation initiation factor eIF4G and PABP leading to shutoff of host translation	[90–93]
2C & 2BC	$2C^{ATPase}$ and precursor 2BC	SL I "b" (Cloverleaf)	-	Only negative-strand synthesis initiation	[36,94]
3B	VPg (Viral protein genome-linked)	5′ ends	$3D^{pol}$	Primer in both positive- and negative-strand RNA synthesis	[95]
$3D^{pol}$	Viral 3D RNA-dependent RNA polymerase	3′ UTR	3B, 3AB, and $3D^{pol}$	Elongation activity	[61]

EV-B: group-B enterovirus, SL: stem-loop, UTR: untranslated region, IRES: Internal Ribosome Entry Site, FUSE: far-upstream element.

The initiation of positive-strand RNA synthesis involves the formation RNP complexes on the replicative form, which unwinds at both ends allowing to the Cloverleaf to interact with cellular and viral proteins. Cellular factors PCBP1/2 and viral $3CD^{pro}$ interact, respectively, on the stem-loop "b" and the stem-loop "d" of the Cloverleaf-like structure in the 5′ NCR of the positive-strand viral RNA [41,74], while nuclear protein Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (hnRNP-C) binds to both ends of the negative-strand [69,96] (Figure 3F and Table 1). Interactions at both ends of the viral double-strand RNA complex with proteins prevent base-pairing with complementary sequence and preserve a single-stranded structure at both ends of the replication form [41]. hnRNP-C oligomerization could, by drawing both ends into proximity, induce negative-strand circularization (Figure 3G). This process results in a stabilized tertiary structure of RNP complex, which allows the initiation of the positive-strand synthesis by the 3D polymerase with uridylylated VPg as primer (Figure 3H). By these successive molecular phases, neo-synthetized positive-strands RNA and viral double-strand RNA complexes are synthesized (Figure 3A,E). During positive-strand RNA synthesis, a large excess of viral positive-strand RNA is simultaneously synthesized from only one negative-strand (60–70-fold increased levels).

Interestingly, hnRNP-C interactions with the 3′ end of EV negative-strand RNA promote the viral proteins recruitment to an initiation complex for positive-strand RNA synthesis, increasing the amplification of genomic RNA [69,96]. Interactions between hnRNP-C and the 3′ end of the EV negative-strand RNA could stabilize the partially duplexed RNA in the replication form by binding of uridylylated VPg, which is an essential step for prime elongation by the $3D^{pol}$ on the intermediate negative-strand RNA template for positive-strand RNA synthesis [69]. Consequently, lack of full-length ends of negative-strand RNA would induce a decrease in interactions between the 5′ and 3′ ends of negative-strand RNA and ribonucleoproteins resulting in a decreased efficiency of the polymerase to synthesize viral positive-strand RNA [96]. Loss of such negative-stranded viral RNA binding sites might contribute to the significant reduction of positive-strand RNA synthesis and aberrant low (+)/(−) viral RNA ratios as described in murine or human tissues chronically infected by persistent viral populations [16,97]. Moreover, low expression levels of replication complex cellular factors such as hnRNP-C could decrease viral genome replication activity levels of full-length ends of negative-strand viral RNA in various human target tissues and cells [18,98]. Overall, hnRNP-C or other unknown host proteins of RNP complexes formed with the 3′ ends of negative-strand could provide an early replicative advantage of full-length viral RNA forms in specific cells and drive the development of enteroviral human infections [17,18,96]. Identification of new cell host proteins of viral RNP complexes could help in designing new therapeutic strategies either targeting or inhibiting host protein activities involving EV-B RNA replication in human infections.

4. Role of Viral Ribonucleoprotein Complexes in the Regulation of Viral Translation and Genomic Replication Processes

Recruitment by RNA domain-I of various host cell proteins in RNP regulates viral translation and genomic replication processes [99]. The Cloverleaf binds PCBP1/2, which facilitates its interaction with the viral $3CD^{pro}$ [50] and which, in the case of PCBP2, is required for both translations and viral RNA synthesis initiation in infected cells [51]. Moreover, cleavage of PCBP2 by the $3CD^{pro}$ contributes to viral translation inhibition [100]. The 5′ NCR of EV-B interacts with hnRNP-K protein which is important for viral replication [64]. Moreover, the Cloverleaf-like structure composed of the initial 1–100 nt region in the 5′ UTR and the IRES of coxsackievirus B3 (CV-B3) are known to interact with Polypyrimidine tract-binding protein (PTB)-associated splicing factor (PSF) [101]. Additionally, the IRES structure of picornaviruses interacts with La, Sam68 (68 kDa Src-associated protein in mitosis), PTB, and SRp20 (Serine/arginine-rich splicing factor) host proteins improving translation [53,102–105]. On the other hand, interactions of ARE/poly(U)-binding/degradation factor 1 (AUF1), Gemin5, and far-upstream element-binding protein 2 (FBP-2) with the 5′ NCR of picornaviruses negatively regulate viral

translation [66,106–108]. The functional significance of these various interactions for the progression of enteroviral infection in human cells remains to be investigated.

5. Natural 5′ Terminal Deletions in EV-B RNA Domain-I During Experimental or Human Infections

EV-B are well known for their high genomic plasticity mainly related to the lack of proofreading activity of the $3D^{pol}$ resulting in approximately one mutation per 10^3–10^5 copied nt [109] in every new genome generated during replication phase [110]. The acquisition of mutations (insertions, substitutions, or deletions) allows the generation of a set of viral sub-populations characterized in quasi-species [111,112]. Among these quasi-species, major EV-B populations were shown to contain 5′ terminal deletions ranging up to 49 nt, increasing in deletion size inside RNA domain-I over viral culture passage or time post-infection in experimental models [113]. Various characterized deletions at the end of the 5′ NCR of EV-B RNA affect the secondary structure, resulting in the loss of stem "a", stem-loop "b", "c", and part of stem-loop "d" of the Cloverleaf structure. The related produced virions could still perform the critical functions of cell infection with low levels of genome replication and viral translation activities [75,114]. Interestingly, these 5′ TD viruses showed long-term viral persistence in vitro and in mice heart or pancreas tissues [113,114].

Similar 5′ NCR deleted viral RNA forms have been reported in EV-B induced cardiac human pathologies as myocarditis and DCM [113–116]. The first clinical characterization of nucleotide deletions in EV-B 5′ NCR was reported in 2008 in endomyocardial biopsy tissues of a CV-B2 induced fulminant viral myocarditis, demonstrating the presence of viral RNA forms deleted 22–36 nt in the 5′ NCR [115]. Recently using deep sequencing strategies, EV-B RNA forms harboring 5′ terminal deletions up to 50 nt were found either alone or present in majority (≈95%) with minor full-length viral forms (≈5%) in heart tissues of a cohort of adult patients with EV-B induced DCM. While 5′ TD viral forms are known to present major defects in viral RNA replication, in vitro experimental results showed that co-transfection of 95% 5′ TD forms with 5% of full-length genome forms into human cardiomyocytes produced higher viral RNA replication activities than transfection with full-length forms alone. In an interesting way, long-term viral replication after this transfection of the mixture led to a lower viral genome synthesis than with those produced by the full-length form alone [16], suggesting a helper function to the minor (full-length) population preserving a functional negative-strand replication but a defect of positive-strand synthesis without any impairment in viral structural and non-structural protein expression [16].

Described 5′ NCR deleted EV-B RNA forms would be defective viral genomes (DVGs) as previously defined with other RNA viruses such as influenza viruses, Sindbis virus, or Sendai virus [117,118]. DVGs are naturally produced viral RNA genomes [119] that displayed three described forms: deleted, copyback, and snapback [120,121]. These truncated forms are naturally produced in the infected host cell and the presence of a helper viral full-length genome (parental genome) is required to perform efficient viral replication activities. These truncated viral RNA forms will compete and decrease parental form replication levels [122]. Interestingly, these DVG forms can overcome the adaptive immune system that activation might clear parental full-length viral forms [123]. Overall, DVG forms could promote the development of high viral genetic diversity levels resulting in the generation of rapidly evolving major populations of viral quasi-species by comparison with the minor parental full-length viral RNA forms [124]. The dynamics of emergence and the impact of DVG or truncated forms onto the enteroviral replication mechanisms and the activation of the innate immune system during early phases of viral infection remains to be investigated.

6. Impact of Natural 5′ Terminal Deletions in Viral RNA Domain-I on EV-B Replication Activities

Partial deletions of the 5′ RNA domain-I sequences significantly disrupt the binding sites of proteins involved in the EV-B RNA synthesis possibly providing a molecular explanation for the low levels of 5′ TD RNA replication in target cells (Figure 4). Investigations by RNA mobility shift assays

indicate that the binding of host protein PCBP2 and viral protein $3CD^{pro}$ to the 5′ end of various deleted forms of positive-strand RNA was qualitatively conserved for the 5′ TD viruses independently of the size of the deletion. However, the stability or protein binding affinity of the RNP complexes decreased with the increase in size of the deletion [18] (Figure 4D). These recent in vitro findings obtained in cultured murine and human cardiac cells provide a possible explanation for the low levels of RNA replication of deleted strains as consequences of the deletions on the formation of RNP complexes. In addition, these data indicate that these low replicative 5′ TD RNA forms may be EV-B persistent populations similar to those observed in clinical studies on heart tissues of patients with unexplained DCM [18].

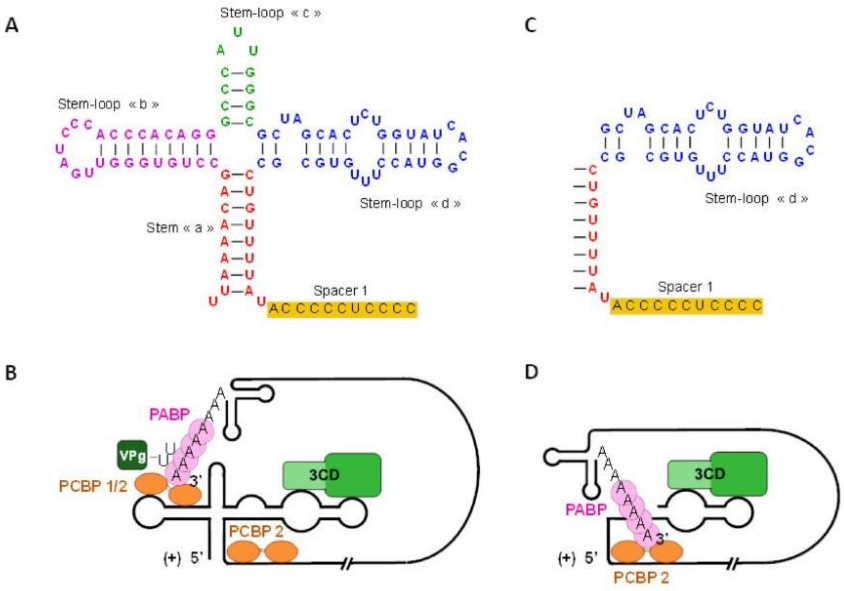


Figure 4. Natural 5′ terminal deletions in RNA domain-I disrupt viral ribonucleoprotein complexes involved in group-B enterovirus replication activities. (**A**) Schematic representation of the complete predicted 5′ end Cloverleaf secondary structures (CL, stem-loop I) of the enteroviral positive-strand RNA. The CL is composed of a stem "a" (nucleotides 2–9 with nucleotides 80–87), stem-loop "b" (nucleotides 10–34), stem-loop "c" (nucleotides 35–45), and a stem-loop "d" (nucleotides 46–79). (**B**) Host cellular protein PABP interacts with the poly(A) tail in the viral genome 3′ end, PCBP 1/2 bind to the stem-loop "b" of the Cloverleaf and in addition, PCBP 2 binds to the spacer 1 at the end of the Cloverleaf. Viral precursor protein 3CD interacts with stem-loop "d" of the Cloverleaf. (**C**) Schematic representation of the 5′ terminally deleted Enterovirus RNA with 50 nucleotides deletions in Cloverleaf secondary structures. (**D**) 5′ terminal deletions in RNA domain-I disrupts the formation of viral ribonucleoprotein complexes: PABP interacts with the 3′ end poly(A) tail, PCBP 2 binds to the spacer 1 at the end of the Cloverleaf, and the precursor 3CD interacts with stem-loop "d" of the Cloverleaf. This loss of interactions with viral protease and cellular factor in stem-loop "b" alters EV-B replication activities.

Interestingly, experimental genetic restoration of the partially deleted Cloverleaf-like secondary structure of described 5′ TD viruses allowed the re-establishment of the viral replication and cellular pathogenesis evidenced through the induction of cytopathic effect on cultured cells [115]. Disrupting PCBP2 binding to either stem-loop "b" or the C-rich sequence inhibits enteroviral RNA

replication identifying PCBP2 cell host protein as one of the main cofactors during viral RNA replication [51,54,55] (Figure 4B,D). Within replication complexes, the presence of at least one PCBP binding site in the 5′ NCR (i.e., stem–loop "b" or C-rich sequence) appeared to be sufficient to support efficient negative-strand synthesis [83,85].

Despite different losses of secondary structures and binding sites of viral or host cell proteins in different known viral RNP complexes, natural 5′ TD forms up to 50 nt show a conservation of the stem-loop "d" structure allowing PCBP2 binding to C-rich sequence spacer 1, which is sufficient to support positive and negative strand synthesis at low levels [75] (Figure 4C,D). An unstable RNP complex requiring higher PCBP2 and $3CD^{pro}$ concentrations sustains 5′ TD RNA low-level replication. These 5′ terminally deletions from 30 to 49 nt induce in silico the tripartite complex formation (PCBP2/$3CD^{pro}$/Domain-I) at 50–60% efficiency compared to that observed with the full-length viral RNA [18]. Overall, partial deletions of this RNA domain up to the stem-loop "c" but preserving the stem-loop "d" resulted in significant decrease levels of viral infectivity by the production encapsidated negative-stranded RNA [18]. These deletions disrupt viral and host protein binding modulating the dynamics of enteroviral infection and potentially driving the development of acute or persistent infections in human target cells. In recent clinical investigations, these naturally generated low replicating deleted viral RNA forms were identified as major populations in human acute myocarditis and chronic DCM cases [16]. In cultured human cardiomyocytes, the deleted viral RNA forms can produce viral proteinases as $2A^{pro}$ whose levels impact on cell host protein synthesis machinery by cleavage of major host cell proteins as eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) [16,18,125,126]. Overall, natural 5′ TD viral genomes resulting in the loss of different structures in the RNA domain-I could be major key players of host–cell interactions in EV-B human infections [17].

7. Impact of Natural 5′ Terminal Deletions in EV-B RNA Domain-I on Type I Interferon Signaling Pathway Activation

The innate immune system plays an essential role in pathogen recognition and initiation of the immune response through the recognition of pathogen-associated molecular profiles (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMPs) by its Pattern Recognition Receptors (PRRs). The viral nucleic acids, RNAs, or DNAs are recognized as PAMPs. PRRs are essential elements in the detection and induction of the innate response to pathogens including viruses. Recently various PRRs sensors of immunity were identified as Toll-Like Receptors (TLRs), RLRs including RIG-I, MDA5 and LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2), and NOD-Like Receptors (NLRs). RLRs have a conserved domain called CTD (C-Terminal Domain), which is responsible for attachment specificity to viral RNAs, whether they are double-stranded RNAs, single-stranded RNAs, or RNAs with a tri-phosphate group at the 5′ end. This C-terminal domain is a repressor domain (RD) which inactivates the caspase recruitment domains (CARD domains) and whose negative regulatory function has only been observed for the RIG-I and LGP2 receptors. The recognition specificity of virus families makes it possible to characterize RLRs; RIG-I is activated by numerous viruses such as Paramyxoviruses, Orthomyxoviruses, Rhabdoviruses, Flaviviruses, and Hepatitis C virus, while MDA5 mainly recognizes viruses of the *Picornaviridae* family and more specifically group-B Enteroviruses, including group-B Coxsackieviruses [127,128]. In order to limit the activation of the host innate immune response by genome RNA sequences, enteroviruses developed various strategies of direct interference on the sensing of cytosolic immune receptors as RLRs during the early phase of viral replication.

A reported strategy developed by EV-B to overcome antiviral immune response is to cleave or partially disrupt RLRs MDA5 receptor during EV-B infection by viral proteases activities, therefore impairing the innate immune sensing of viral RNA double-strand forms [127,129–132] (Figure 5). For poliovirus, CV-B3, and EV-71, the $2A^{pro}$ activity results in the disruption of MDA5 structures, even though some authors discuss that such MDA5 or mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) cleavage may take place in a proteasome-dependent or activated caspase-3 pathway [129,133,134]. To transfer the signal downstream in the type I IFN signaling pathway, ligand-bound MDA5 (CARD)

links to the adaptor molecule MAVS at the mitochondrial membrane (Figure 5). In a similar way, the $3C^{pro}$ of EV-B can cleave various intermediate protein factors of the type I IFN pathway [135] including RIG-I receptor (Figure 5) [133,136]. Indeed, $3C^{pro}$ activity can mediate the cleavage of key molecules such as transforming growth factor-β activated kinase 1 (TAK1)/TGF-β Activated Kinase 1 (TAB1)/TAB2/TAB3 complex which are known to activate the Nuclear factor kappa B pathway inducing a pro-inflammatory cytokine expression [137] (Figure 5). Moreover, EV-71 $3C^{pro}$ activity was described as capable to cleave Interferon Regulatory Factor 7 (IRF-7) inhibiting its ability to transactivate IFN-β expression by its phosphorylated form during early phase of viral infection [133] (Figure 5).

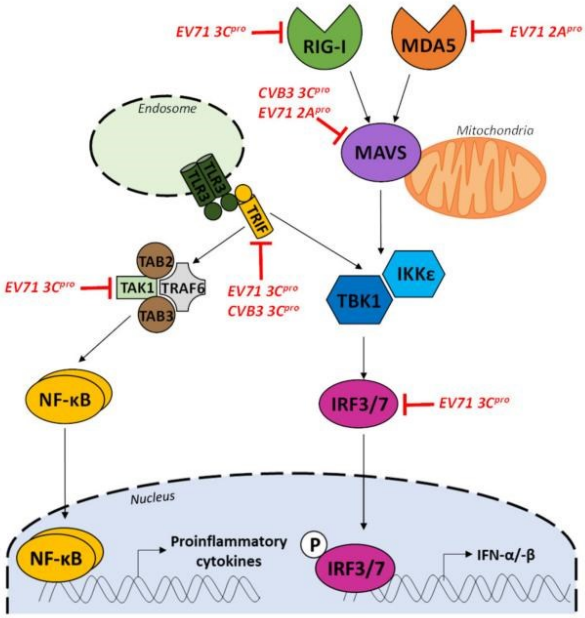


Figure 5. Group-B enterovirus proteinase activities impair type 1 signaling pathway activation in infected cells. Enterovirus proteinase 3C ($3C^{pro}$) and $2A^{pro}$ are mainly involved in downregulation of type I IFN, pro-inflammatory cytokines at different stages. The interacting cellular signaling molecules with different viral proteins are indicated at each level. (MDA5: melanoma-differentiation-associated protein 5, RIG-I: retinoic acid-inducible gene 1, MAVS: mitochondrial antiviral-signaling protein, TBK1: TANK-binding kinase 1, IRF3/7: Interferon Regulatory Factor 3/7, TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β, TLR: toll-like receptors, TRAF6: TNF receptor-associated factor 6, TAK1: transforming growth factor-β activated kinase 1, TAB2/3: TGF-β Activated Kinase 2/3, IFNs: interferons).

Natural truncated forms of up to 50 nt in the 5′ NCR of the EV-B in experimental or clinical infections [16,116] would allow the maintenance of the viral genome in the infected host cell by a modulated activation of the innate immune system [17] (Figure 6). Recently, these 5′ TD EV-B RNA forms showed their ability, alone, to produce in silico, in vitro, and in vivo viral proteins such as the viral 2A proteinase resulting in $2A^{pro}$-specific eIF4G cleavage [16]. This suggests that natural 5′ TD forms helped by a full-length RNA virus are capable of replicating their genome and translating their proteins at low levels. These low levels of viral proteinases can lead to the potential cleavage and extinction of viral genome recognition by RLRs. Low replication of 5′ TD EV-B RNA forms associated

with low synthesis and activity of $2A^{pro}$ and $3C^{pro}$ inducing cleavage of the MDA5 or RIG-I receptors as well as MAVS intermediate remain to be fully elucidated in experimental in vitro and in vivo models.

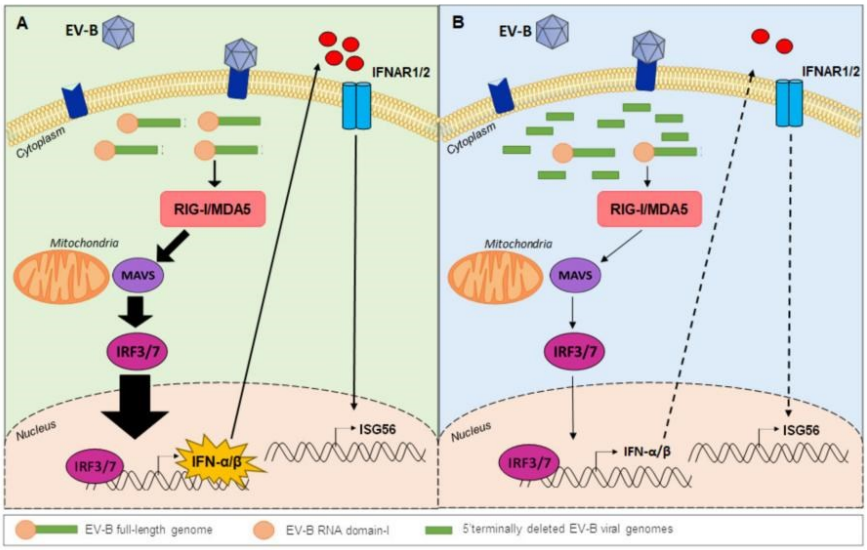


Figure 6. Natural 5′ terminally deleted group-B enterovirus RNA forms can modulate type I interferon signaling pathway activation. (**A**) Full-length viral RNA is recognized by cytoplasmic sensors RIG-I or MDA5 in EV-B infections. Signaling through the adaptor protein MAVS leads to IRF3 activation and translocation to the nucleus. These molecules stimulate high level of IFN-α/β and ISG56 production for the development of effective antiviral responses to EV-B infections. (**B**) According to recent reports, deleted viral genomes were associated with parental complete virus in early phase group-B enterovirus infection. Host cell proteins recruited in viral RNP complexes or potentially acting as a restriction factors could provide an evolutionary advantage to the 5′ NCR truncated viral RNA forms. Deletion in RNA domain-I (5′ terminally deleted viral genomes) could impair the viral genomic RNA recognition by RLRs (RIG-I or MDA5) immune sensors during the early phase of antiviral innate immune response resulting in low level of IFN-α/β and ISG56 production. IFN: interferon; RIG-I: retinoic acid-inducible gene-I; MDA5: melanoma differentiation-associated protein 5; MAVS: mitochondria antiviral-signaling protein; IRF: Interferon Regulatory Factor 3; ISG56: interferon stimulated gene 56; 5′ NCR: 5′ non-coding region.

EV-B RNA domain-I secondary structures in the 5′ UTR may be critical in the host recognition of the viral genome by RLRs, which is crucial for triggering an host innate immune response [20,133] (Figure 6A). Previous studies demonstrated the importance of some nucleotide variations in the 5′ NCR, showing that deletions or point mutations affect the secondary structures of EV-B RNA domain-I [99]. The loss of one or several secondary structures of RNA domain-I could impair the viral genomic RNA recognition by RLRs (RIG-I or MDA5) immune sensors during the early phase of antiviral innate immune response or could contribute to the virus ability to escape the innate immune response [99] (Figure 6B). This hypothesis is supported by a recent report demonstrating that two major 5′ TD viral RNA population groups were identified in peripheral blood or heart tissue samples of EV-B acute myocarditis cases and that their respective proportions appeared to be positively or negatively correlated with type I IFN levels [17]. To confirm immunomodulatory effects of these 5′ TD RNA forms on the type I IFN pathway induction, synthetic CV-B3/28 RNAs harboring various 5′ terminal full-length or deleted genomic sequences were produced by the authors and transfected into human primary cardiomyocytes cultures [17]. This experimental approach demonstrates that EV-B genomic

RNA domain-I possesses essential immunomodulatory secondary-structural elements responsible for IFN-β pathway induction in human cardiomyocytes. Natural 5′ terminally RNA deletions disrupting secondary structures of RNA domain-I could result in a differential qualitative binding of EV-B 5′ TD RNA sequences to the RLRs (RIG-I or MDA5) acting as major innate immune sensors during EV-B acute infections (Figure 6). Modulation of RLRs activation by 5′ terminal RNA structures of EV-B 5′ TD viruses could impair type I IFN pathway activation, thus regulating IFN-β and interferon-stimulated gene (ISG) transcription and translation levels in target cells, a way to overcome antiviral innate immune response [17] (Figure 6).

8. Involvement of Natural 5′ Terminally Deleted EV-B RNA Forms in Persistent Infections

RNA viruses including picornaviruses have been shown to develop persistent infections in human target tissues [120,138–140]. Among human picornaviruses, polioviruses and group-B coxsackieviruses have been shown to establish persistent infections in target tissues resulting in chronic pathologies such as type 1 diabetes and DCM [120]. Cellular and molecular mechanisms underlying establishment and maintenance of persistent EV-B infections remain unknown. In vivo, specifically in chronic myocarditis or DCM, EV-B persistent infection has been defined by several associated viral criteria including: a low viral RNA load (<3 $\log_{10}$ genome copies per microgram of total nucleic acids extracted), an absence of detected infectious particle by classical culture assays, a plus- to minus-strand viral RNA ratio <5 and the detection of a viral protein synthesis activity [141]. Emergence and maintenance of persistent EV-B forms during acute infection depend on early host–virus interactions.

Emergence of 5′ TD viral populations has been proposed as a molecular mechanism for enterovirus persistence in vivo [116,140]. The association of minor full-length RNA and major 5′ TD viral populations has been found in mouse models and in human persistent cardiac infections [16,114,116]. Full-length EV-B RNA population could help 5′ TD RNA forms replication by genomic recombination processes, sustaining synthesis of negative-strand RNA but not positive-strand [18,142]. Such a scenario would lead to low viral loads, accumulation of double-strand and minus RNA complexes, and undetectable infectious particles which are hallmarks of viral persistence [140,143].

Maintenance of the viral genome is a key step to establish viral RNA persistence in target cells [19]. 5′ TD RNA forms associated with long-term viral persistence described above are known for low-levels of replication activity and progeny [16]. These truncated viral populations displayed 5′ NCR deletions in RNA domain-I disrupting secondary RNA structures, which could impair viral RNA sensing by RLRs and result in a modulation of type I IFN expression in target cells [17]. Given that 5′ TD viruses are low replicating forms, the generation or maintenance of such variants could be an efficient process for EV-B to develop a chronic persistent infection in human target cells long after the acute infection phase [16,18,144–147]. The combination of low-level replication and translation activities of naturally produced 5′ TD viruses, associated with the capacity of these RNA forms to modulate type-I IFN response activation pathway could explain long-lasting detection of EV-B genome in some human target tissues such as heart and pancreas.

9. Conclusions and Future Directions

The 5′ NCR of EV-B is involved in key steps of the viral life cycle. The recruitment by RNA domain-I of host cell and viral proteins in RNP complexes is essential for viral translation and genomic replication processes. Natural deletions within the 5′ NCR of EV-B forms affect functional secondary-structural elements of the RNA domain-I. The loss of these secondary structures of RNA Cloverleaf reduces the binding of viral and cellular proteins implicated in EV-B genome replication mechanisms, therefore modulating the viral fitness and infectivity of viral populations. Early emergence of 5′ TD viral populations and their maintenance in infected cells have been recently proposed as a potential molecular mechanism driving the development of EV-B human acute and persistent infections [16,17]. Further research programs will aim to identify unknown host cell proteins recruited in viral RNP complexes implicated in 5′ TD EV-B replication process or potentially acting as restriction

factors providing an evolutionary advantage to the 5′ NCR truncated viral RNA forms. A genome wide CRISPR–Cas9 screen in near haploid human HAP1 cells approach could uncover differences between host proteins factors crucial for infection and replication of EV-B full-length or 5′ TD forms in human target cells [148]. Identification of new cell host proteins implicated in viral RNP complexes or unknown host cell restriction factors could be a promising new therapeutic strategy targeting or inhibiting host protein activities involved in either the replication or selection of viral populations with 5′ terminal deletions in viral RNA domain-I.

In addition, to disturb viral genome RNA replication processes, 5′NCR deletions could impair the viral RNA recognition by RLRs, inducing the modulation of type I IFN expression, specifically by regulating IFN-β and ISG transcription and translation levels in target cells [17]. Other unexplored mechanisms developed by EV-B could also overcome antiviral innate immune response. Indeed, post-transcriptional RNA modifications commonly called epitranscriptome, are observed at specific residues of cellular RNA and play a key role in their maturation and their functionality and can determine the sensing of viral RNA sequences by RLRs [149–151]. Among the numerous chemical modifications described, the methylation of nucleotides in various nucleotide positions is the most abundant in eukaryotic cells. To date, very few studies have so far been devoted to modifications of viral RNA and despite the identification of certain modifications of RNA present in viruses, little information is known about their roles in infection and spread of viral pathogens. Several modifications of viral RNA appear today fundamental for the regulation of arboviruses (ZIKA and Dengue) and other virus replication and spread [152,153]. The 2′O-Methylation of the viral mRNA cap by West Nile virus evades innate immune response by modulating type I IFN pathway activation [149,154]. However, such post-transcriptional modifications in EV-B RNA and their impact on the activation of type I IFN pathway and more specifically on the viral RNA sensing by RLRs are not yet investigated. Using new detection approaches based on genome-wide high-throughput sequencing, further scientific projects have to map the EV-B RNA post-transcriptional modifications and to investigate their impact on the regulation of innate immune response in the early phase of host cell infection.

Finally, published reports and ongoing scientific investigations highlight the importance of secondary structures of RNA domain-I and related functional RNP complexes in the EV-B infectious cycle and related host cell immune response. Overall, natural 5′ TD viral genomes resulting in the loss of different structures in the RNA domain-I could be major key players of host–cell interactions driving the development of acute or persistent EV-B infections in human target cells.

Author Contributions: Conceptualization, L.A., M.G. and L.H.; methodology, L.A., M.G. and L.H.; formal analysis, L.A., M.G., L.H., A.-L.L., D.C., P.-A.G. and F.B.; investigation, L.A., M.G., L.H., A.-L.L., Y.N., D.C., P.-A.G. and F.B.; writing—original draft preparation, L.A., M.G., L.H., A.-L.L., Y.N., D.C. and F.B.; writing—review and editing, L.A., M.G., L.H., A.-L.L., D.C. and F.B.; visualization, L.A., M.G., L.H., A-L.L., D.C. and F.B.; supervision, L.A.; project administration, L.A.; funding acquisition, L.A., F.B., Y.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grant from the "Fédération Française de Cardiologie" (FFC grant 2019 "Etude CardioVir") and by a local research grant for emerging research teams from the University of Reims Champagne-Ardenne (URCA), France.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Simonen-Tikka, M.-L.; Hiekka, A.-K.; Klemola, P.; Poussa, T.; Ludvigsson, J.; Korpela, R.; Vaarala, O.; Roivainen, M. Early human enterovirus infections in healthy Swedish children participating in the PRODIA pilot study. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 923–930. [CrossRef] [PubMed]
2. Witsø, E.; Palacios, G.; Cinek, O.; Stene, L.C.; Grinde, B.; Janowitz, D.; Lipkin, W.I.; Rønningen, K.S. High prevalence of human enterovirus a infections in natural circulation of human enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 4095–4100. [CrossRef] [PubMed]

3. Oberste, M.S.; Maher, K.; Kilpatrick, D.R.; Pallansch, M.A. Molecular evolution of the human enteroviruses: Correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* **1999**, *73*, 1941–1948. [CrossRef] [PubMed]
4. Genoni, A.; Canducci, F.; Rossi, A.; Broccolo, F.; Chumakov, K.; Bono, G.; Salerno-Uriarte, J.; Salvatoni, A.; Pugliese, A.; Toniolo, A. Revealing enterovirus infection in chronic human disorders: An integrated diagnostic approach. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5013. [CrossRef]
5. Chia, J.K.S. The role of enterovirus in chronic fatigue syndrome. *J. Clin. Pathol.* **2005**, *58*, 1126–1132. [CrossRef]
6. Huber, S.A. Viral Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy: Etiology and Pathogenesis. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 408–426. [CrossRef]
7. Nekoua, M.P.; Bertin, A.; Sane, F.; Alidjinou, E.K.; Lobert, D.; Trauet, J.; Hober, C.; Engelmann, I.; Moutairou, K.; Yessoufou, A.; et al. Pancreatic beta cells persistently infected with coxsackievirus B4 are targets of NK cell-mediated cytolytic activity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 179–194. [CrossRef]
8. King, A.M.Q.; Lefkowitz, E.J.; Mushegian, A.R.; Adams, M.J.; Dutilh, B.E.; Gorbalenya, A.E.; Harrach, B.; Harrison, R.L.; Junglen, S.; Knowles, N.J.; et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 2601–2631. [CrossRef]
9. Simmonds, P.; Gorbalenya, A.E.; Harvala, H.; Hovi, T.; Knowles, N.J.; Lindberg, A.M.; Oberste, M.S.; Palmenberg, A.C.; Reuter, G.; Skern, T.; et al. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch. Virol* **2020**. [CrossRef]
10. Zell, R.; Delwart, E.; Gorbalenya, A.E.; Hovi, T.; King, A.M.Q.; Knowles, N.J.; Lindberg, A.M.; Pallansch, M.A.; Palmenberg, A.C.; Reuter, G.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 2421–2422. [CrossRef]
11. Zell, R. Picornaviridae-the ever-growing virus family. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 299–317. [CrossRef] [PubMed]
12. Walker, P.J.; Siddell, S.G.; Lefkowitz, E.J.; Mushegian, A.R.; Dempsey, D.M.; Dutilh, B.E.; Harrach, B.; Harrison, R.L.; Hendrickson, R.C.; Junglen, S.; et al. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 2417–2429. [CrossRef] [PubMed]
13. Lulla, V.; Dinan, A.M.; Hosmillo, M.; Chaudhry, Y.; Sherry, L.; Irigoyen, N.; Nayak, K.M.; Stonehouse, N.J.; Zilbauer, M.; Goodfellow, I.; et al. An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells. *Nat. Microbiol* **2019**, *4*, 280–292. [CrossRef] [PubMed]
14. Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M.; Griffin, D.E. *Fields Virology*, 4th ed.; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2001; Chapter 23.
15. Badorff, C.; Lee, G.H.; Lamphear, B.J.; Martone, M.E.; Campbell, K.P.; Rhoads, R.E.; Knowlton, K.U. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: Evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 320–326. [CrossRef]
16. Bouin, A.; Gretteau, P.-A.; Wehbe, M.; Renois, F.; N'Guyen, Y.; Leveque, N.; Vu, M.N.; Tracy, S.; Chapman, N.M.; Bruneval, P.; 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**. [CrossRef]
17. Glenet, M.; N'Guyen, Y.; Mirand, A.; Henquell, C.; Lebreil, A.-L.; Berri, F.; Bani-Sadr, F.; Lina, B.; Schuffenecker, I.; Andreoletti, L.; et al. Major 5′terminally deleted enterovirus populations modulate type I IFN response in acute myocarditis patients and in human cultured cardiomyocytes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11947. [CrossRef]
18. Lévêque, N.; Garcia, M.; Bouin, A.; Nguyen, J.H.C.; Tran, G.P.; Andreoletti, L.; Semler, B.L. Functional Consequences of RNA 5′-Terminal Deletions on Coxsackievirus B3 RNA Replication and Ribonucleoprotein Complex Formation. *J. Virol.* **2017**, *91*. [CrossRef]
19. Ullmer, W.; Semler, B.L. Diverse Strategies Used by Picornaviruses to Escape Host RNA Decay Pathways. *Viruses* **2016**, *8*. [CrossRef]
20. Feng, Q.; Langereis, M.A.; Olagnier, D.; Chiang, C.; van de Winkel, R.; van Essen, P.; Zoll, J.; Hiscott, J.; van Kuppeveld, F.J.M. Coxsackievirus cloverleaf RNA containing a 5′ triphosphate triggers an antiviral response via RIG-I activation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95927. [CrossRef]

21. Bailey, J.M.; Tapprich, W.E. Structure of the 5′ Nontranslated Region of the Coxsackievirus B3 Genome: Chemical Modification and Comparative Sequence Analysis. *J. Virol.* **2007**, *81*, 650–668. [CrossRef]
22. Jang, S.K.; Kräusslich, H.G.; Nicklin, M.J.; Duke, G.M.; Palmenberg, A.C.; Wimmer, E. A segment of the 5′ nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* **1988**, *62*, 2636–2643. [CrossRef] [PubMed]
23. Pelletier, J.; Sonenberg, N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **1988**, *334*, 320–325. [CrossRef] [PubMed]
24. Trono, D.; Pelletier, J.; Sonenberg, N.; Baltimore, D. Translation in mammalian cells of a gene linked to the poliovirus 5′ noncoding region. *Science* **1988**, *241*, 445–448. [CrossRef] [PubMed]
25. Shiroki, K.; Ishii, T.; Aoki, T.; Ota, Y.; Yang, W.X.; Komatsu, T.; Ami, Y.; Arita, M.; Abe, S.; Hashizume, S.; et al. Host range phenotype induced by mutations in the internal ribosomal entry site of poliovirus RNA. *J. Virol.* **1997**, *71*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
26. Li, Z.; Liu, X.; Wang, S.; Li, J.; Hou, M.; Liu, G.; Zhang, W.; Yu, X.-F. Identification of a nucleotide in 5′ untranslated region contributing to virus replication and virulence of Coxsackievirus A16. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20839. [CrossRef]
27. Willian, S.; Tracy, S.; Chapman, N.; Leser, S.; Romero, J.; Shapiro, B.; Currey, K. Mutations in a conserved enteroviral RNA oligonucleotide sequence affect positive strand viral RNA synthesis. *Arch. Virol.* **2000**, *145*, 2061–2086. [CrossRef]
28. Dunn, J.J.; Bradrick, S.S.; Chapman, N.M.; Tracy, S.M.; Romero, J.R. The stem loop II within the 5′ nontranslated region of clinical coxsackievirus B3 genomes determines cardiovirulence phenotype in a murine model. *J. Infect. Dis.* **2003**, *187*, 1552–1561. [CrossRef]
29. Prusa, J.; Missak, J.; Kittrell, J.; Evans, J.J.; Tapprich, W.E. Major alteration in coxsackievirus B3 genomic RNA structure distinguishes a virulent strain from an avirulent strain. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 10112–10121. [CrossRef]
30. Knipe, D.M.; Howley, P.M. *Fields Virology*, 6th ed.; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; Chapter 16; pp. 453–489.
31. Guo, H.; Li, Y.; Liu, G.; Jiang, Y.; Shen, S.; Bi, R.; Huang, H.; Cheng, T.; Wang, C.; Wei, W. A second open reading frame in human enterovirus determines viral replication in intestinal epithelial cells. *Nat. Commun* **2019**, *10*, 4066. [CrossRef]
32. Andino, R.; Böddeker, N.; Silvera, D.; Gamarnik, A.V. Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol.* **1999**, *7*, 76–82. [CrossRef]
33. Cheung, P.K.; Yuan, J.; Zhang, H.M.; Chau, D.; Yanagawa, B.; Suarez, A.; McManus, B.; Yang, D. Specific interactions of mouse organ proteins with the 5′untranslated region of coxsackievirus B3: Potential determinants of viral tissue tropism. *J. Med Virol.* **2005**, *77*, 414–424. [CrossRef] [PubMed]
34. Holmes, A.C.; Semler, B.L. Picornaviruses and RNA Metabolism: Local and Global Effects of Infection. *J. Virol.* **2019**, *93*. [CrossRef] [PubMed]
35. Witwer, C.; Rauscher, S.; Hofacker, I.L.; Stadler, P.F. Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 5079–5089. [CrossRef] [PubMed]
36. Andino, R.; Rieckhof, G.E.; Baltimore, D. A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5′ end of poliovirus RNA. *Cell* **1990**, *63*, 369–380. [CrossRef]
37. Rohll, J.B.; Percy, N.; Ley, R.; Evans, D.J.; Almond, J.W.; Barclay, W.S. The 5′-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation. *J. Virol.* **1994**, *68*, 4384–4391. [CrossRef]
38. Rieder, E.; Paul, A.V.; Kim, D.W.; van Boom, J.H.; Wimmer, E. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J. Virol.* **2000**, *74*, 10371–10380. [CrossRef]
39. Barton, D.J.; O'Donnell, B.J.; Flanegan, J.B. 5′ cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J.* **2001**, *20*, 1439–1448. [CrossRef]
40. Lyons, T.; Murray, K.E.; Roberts, A.W.; Barton, D.J. Poliovirus 5′-terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **2001**, *75*, 10696–10708. [CrossRef]
41. Vogt, D.A.; Andino, R. An RNA Element at the 5′-End of the Poliovirus Genome Functions as a General Promoter for RNA Synthesis. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*. [CrossRef]

42. Meredith, J.M.; Rohll, J.B.; Almond, J.W.; Evans, D.J. Similar interactions of the poliovirus and rhinovirus 3D polymerases with the 3′ untranslated region of rhinovirus 14. *J. Virol.* **1999**, *73*, 9952–9958. [CrossRef]
43. Rohll, J.B.; Moon, D.H.; Evans, D.J.; Almond, J.W. The 3′ untranslated region of picornavirus RNA: Features required for efficient genome replication. *J. Virol.* **1995**, *69*, 7835–7844. [CrossRef] [PubMed]
44. Herold, J.; Andino, R. Poliovirus RNA Replication Requires Genome Circularization through a Protein–Protein Bridge. *Mol. Cell* **2001**, *7*, 581–591. [CrossRef]
45. van Ooij, M.J.M.; Vogt, D.A.; Paul, A.; Castro, C.; Kuijpers, J.; van Kuppeveld, F.J.M.; Cameron, C.E.; Wimmer, E.; Andino, R.; Melchers, W.J.G. Structural and functional characterization of the coxsackievirus B3 CRE(2C): Role of CRE(2C) in negative- and positive-strand RNA synthesis. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 103–113. [CrossRef] [PubMed]
46. Murray, K.E.; Barton, D.J. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **2003**, *77*, 4739–4750. [CrossRef] [PubMed]
47. Goodfellow, I.; Chaudhry, Y.; Richardson, A.; Meredith, J.; Almond, J.W.; Barclay, W.; Evans, D.J. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.* **2000**, *74*, 4590–4600. [CrossRef]
48. Morasco, B.J.; Sharma, N.; Parilla, J.; Flanegan, J.B. Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **2003**, *77*, 5136–5144. [CrossRef]
49. Brown, D.M.; Cornell, C.T.; Tran, G.P.; Nguyen, J.H.C.; Semler, B.L. An authentic 3′ noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J. Virol.* **2005**, *79*, 11962–11973. [CrossRef]
50. Gamarnik, A.V.; Andino, R. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5′ noncoding region of poliovirus RNA. *RNA* **1997**, *3*, 882–892.
51. Walter, B.L.; Parsley, T.B.; Ehrenfeld, E.; Semler, B.L. Distinct poly(rC) binding protein KH domain determinants for poliovirus translation initiation and viral RNA replication. *J. Virol.* **2002**, *76*, 12008–12022. [CrossRef]
52. Murray, K.E.; Roberts, A.W.; Barton, D.J. Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA* **2001**, *7*, 1126–1141. [CrossRef]
53. Bedard, K.M.; Daijogo, S.; Semler, B.L. A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *EMBO J.* **2007**, *26*, 459–467. [CrossRef] [PubMed]
54. Spear, A.; Sharma, N.; Flanegan, J.B. Protein-RNA tethering: The role of poly(C) binding protein 2 in poliovirus RNA replication. *Virology* **2008**, *374*, 280–291. [CrossRef] [PubMed]
55. Toyoda, H.; Franco, D.; Fujita, K.; Paul, A.V.; Wimmer, E. Replication of poliovirus requires binding of the poly(rC) binding protein to the cloverleaf as well as to the adjacent C-rich spacer sequence between the cloverleaf and the internal ribosomal entry site. *J. Virol.* **2007**, *81*, 10017–10028. [CrossRef] [PubMed]
56. 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* **1997**, *3*, 1124–1134.
57. Perera, R.; Daijogo, S.; Walter, B.L.; Nguyen, J.H.C.; Semler, B.L. Cellular Protein Modification by Poliovirus: The Two Faces of Poly(rC)-Binding Protein. *J. Virol* **2007**, *81*, 8919–8932. [CrossRef]
58. Sean, P.; Nguyen, J.H.C.; Semler, B.L. The linker domain of poly(rC) binding protein 2 is a major determinant in poliovirus cap-independent translation. *Virology* **2008**, *378*, 243–253. [CrossRef]
59. Zell, R.; Ihle, Y.; Seitz, S.; Gündel, U.; Wutzler, P.; Görlach, M. Poly(rC)-binding protein 2 interacts with the oligo(rC) tract of coxsackievirus B3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *366*, 917–921. [CrossRef]
60. Zell, R.; Ihle, Y.; Effenberger, M.; Seitz, S.; Wutzler, P.; Görlach, M. Interaction of poly(rC)-binding protein 2 domains KH1 and KH3 with coxsackievirus RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 500–503. [CrossRef]
61. Harris, K.S.; Xiang, W.; Alexander, L.; Lane, W.S.; Paul, A.V.; Wimmer, E. 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.* **1994**, *269*, 27004–27014.
62. Cheung, P.; Zhang, M.; Yuan, J.; Chau, D.; Yanagawa, B.; McManus, B.; Yang, D. Specific interactions of HeLa cell proteins with Coxsackievirus B3 RNA: La autoantigen binds differentially to multiple sites within the 5′ untranslated region. *Virus Res.* **2002**, *90*, 23–36. [CrossRef]
63. Cheung, P.; Lim, T.; Yuan, J.; Zhang, M.; Chau, D.; McManus, B.; Yang, D. Specific interaction of HeLa cell proteins with coxsackievirus B3 3′UTR: La autoantigen binds the 3′ and 5′UTR independently of the poly(A) tail. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9*, 1705–1715. [CrossRef] [PubMed]

64. Lin, J.-Y.; Li, M.-L.; Huang, P.-N.; Chien, K.-Y.; Horng, J.-T.; Shih, S.-R. Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with the enterovirus 71 5′ untranslated region and participates in virus replication. *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 2540–2549. [CrossRef] [PubMed]
65. Shih, S.-R.; Stollar, V.; Li, M.-L. Host Factors in Enterovirus 71 Replication. *J. Virol.* **2011**, *85*, 9658–9666. [CrossRef] [PubMed]
66. Lin, J.-Y.; Shih, S.-R.; Pan, M.; Li, C.; Lue, C.-F.; Stollar, V.; Li, M.-L. hnRNP A1 interacts with the 5′ untranslated regions of enterovirus 71 and Sindbis virus RNA and is required for viral replication. *J. Virol.* **2009**, *83*, 6106–6114. [CrossRef] [PubMed]
67. Levengood, J.D.; Tolbert, M.; Li, M.-L.; Tolbert, B.S. High-affinity interaction of hnRNP A1 with conserved RNA structural elements is required for translation and replication of enterovirus 71. *RNA Biol* **2013**, *10*, 1136–1145. [CrossRef] [PubMed]
68. Li, Q.; Zheng, Z.; Liu, Y.; Zhang, Z.; Liu, Q.; Meng, J.; Ke, X.; Hu, Q.; Wang, H. 2C Proteins of Enteroviruses Suppress IKKβ Phosphorylation by Recruiting Protein Phosphatase 1. *J. Virol.* **2016**, *90*, 5141–5151. [CrossRef]
69. Brunner, J.E.; Nguyen, J.H.C.; Roehl, H.H.; Ho, T.V.; Swiderek, K.M.; Semler, B.L. Functional interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C with poliovirus RNA synthesis initiation complexes. *J. Virol.* **2005**, *79*, 3254–3266. [CrossRef]
70. Dreyfuss, G.; Matunis, M.J.; Piñol-Roma, S.; Burd, C.G. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 289–321. [CrossRef]
71. Roehl, H.H.; Semler, B.L. Poliovirus infection enhances the formation of two ribonucleoprotein complexes at the 3′ end of viral negative-strand RNA. *J. Virol.* **1995**, *69*, 2954–2961. [CrossRef]
72. Svitkin, Y.V.; Costa-Mattioli, M.; Herdy, B.; Perreault, S.; Sonenberg, N. Stimulation of picornavirus replication by the poly(A) tail in a cell-free extract is largely independent of the poly(A) binding protein (PABP). *RNA* **2007**, *13*, 2330–2340. [CrossRef]
73. Molla, A.; Harris, K.S.; Paul, A.V.; Shin, S.H.; Mugavero, J.; Wimmer, E. Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27015–27020. [PubMed]
74. Zell, R.; Sidigi, K.; Bucci, E.; Stelzner, A.; Görlach, M. Determinants of the recognition of enteroviral cloverleaf RNA by coxsackievirus B3 proteinase 3C. *RNA* **2002**, *8*, 188–201. [CrossRef] [PubMed]
75. Sharma, N.; Ogram, S.A.; Morasco, B.J.; Spear, A.; Chapman, N.M.; Flanegan, J.B. Functional role of the 5′terminal cloverleaf in Coxsackievirus RNA replication. *Virology* **2009**, *393*, 238–249. [CrossRef]
76. Claridge, J.K.; Headey, S.J.; Chow, J.Y.H.; Schwalbe, M.; Edwards, P.J.; Jeffries, C.M.; Venugopal, H.; Trewhella, J.; Pascal, S.M. A picornaviral loop-to-loop replication complex. *J. Struct. Biol.* **2009**, *166*, 251–262. [CrossRef] [PubMed]
77. Headey, S.J.; Huang, H.; Claridge, J.K.; Soares, G.A.; Dutta, K.; Schwalbe, M.; Yang, D.; Pascal, S.M. NMR structure of stem-loop D from human rhinovirus-14. *RNA* **2007**, *13*, 351–360. [CrossRef]
78. Ohlenschläger, O.; Wöhnert, J.; Bucci, E.; Seitz, S.; Häfner, S.; Ramachandran, R.; Zell, R.; Görlach, M. The structure of the stemloop D subdomain of coxsackievirus B3 cloverleaf RNA and its interaction with the proteinase 3C. *Structure* **2004**, *12*, 237–248. [CrossRef]
79. Pathak, H.B.; Arnold, J.J.; Wiegand, P.N.; Hargittai, M.R.S.; Cameron, C.E. Picornavirus genome replication: Assembly and organization of the VPg uridylylation ribonucleoprotein (initiation) complex. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16202–16213. [CrossRef]
80. Prostova, M.A.; Deviatkin, A.A.; Tcelykh, I.O.; Lukashev, A.N.; Gmyl, A.P. Independent evolution of tetraloop in enterovirus oriL replicative element and its putative binding partners in virus protein 3C. *PeerJ* **2017**, *5*, e3896. [CrossRef]
81. Rieder, E.; Xiang, W.; Paul, A.; Wimmer, E. Analysis of the cloverleaf element in a human rhinovirus type 14/poliovirus chimera: Correlation of subdomain D structure, ternary protein complex formation and virus replication. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2203–2216. [CrossRef]
82. Sun, D.; Chen, S.; Cheng, A.; Wang, M. Roles of the Picornaviral 3C Proteinase in the Viral Life Cycle and Host Cells. *Viruses* **2016**, *8*, 82. [CrossRef]
83. Gamarnik, A.V.; Andino, R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2293–2304. [CrossRef] [PubMed]
84. Cornell, C.T.; Semler, B.L. Subdomain specific functions of the RNA polymerase region of poliovirus 3CD polypeptide. *Virology* **2002**, *298*, 200–213. [CrossRef] [PubMed]

85. Gamarnik, A.V.; Andino, R. Interactions of viral protein 3CD and poly(rC) binding protein with the 5′ untranslated region of the poliovirus genome. *J. Virol.* **2000**, *74*, 2219–2226. [CrossRef]
86. Prostova, M.A.; Gmyl, A.P.; Bakhmutov, D.V.; Shishova, A.A.; Khitrina, E.V.; Kolesnikova, M.S.; Serebryakova, M.V.; Isaeva, O.V.; Agol, V.I. Mutational robustness and resilience of a replicative cis-element of RNA virus: Promiscuity, limitations, relevance. *RNA Biol.* **2015**, *12*, 1338–1354. [CrossRef] [PubMed]
87. Xiang, W.; Harris, K.S.; Alexander, L.; Wimmer, E. Interaction between the 5′-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J. Virol.* **1995**, *69*, 3658–3667. [CrossRef] [PubMed]
88. Yang, Y.; Rijnbrand, R.; Watowich, S.; Lemon, S.M. Genetic evidence for an interaction between a picornaviral cis-acting RNA replication element and 3CD protein. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 12659–12667. [CrossRef]
89. Lin, J.-Y.; Chen, T.-C.; Weng, K.-F.; Chang, S.-C.; Chen, L.-L.; Shih, S.-R. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 103. [CrossRef]
90. Kräusslich, H.G.; Nicklin, M.J.; Toyoda, H.; Etchison, D.; Wimmer, E. Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.* **1987**, *61*, 2711–2718. [CrossRef]
91. Joachims, M.; Van Breugel, P.C.; Lloyd, R.E. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J. Virol.* **1999**, *73*, 718–727. [CrossRef]
92. Mu, Z.; Wang, B.; Zhang, X.; Gao, X.; Qin, B.; Zhao, Z.; Cui, S. Crystal structure of 2A proteinase from hand, foot and mouth disease virus. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 4530–4543. [CrossRef]
93. Yang, C.-H.; Li, H.-C.; Jiang, J.-G.; Hsu, C.-F.; Wang, Y.-J.; Lai, M.-J.; Juang, Y.-L.; Lo, S.-Y. Enterovirus type 71 2A protease functions as a transcriptional activator in yeast. *J. Biomed. Sci.* **2010**, *17*, 65. [CrossRef] [PubMed]
94. Banerjee, R.; Tsai, W.; Kim, W.; Dasgupta, A. Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3′ terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b. *Virology* **2001**, *280*, 41–51. [CrossRef]
95. Pettersson, R.F.; Ambros, V.; Baltimore, D. Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J. Virol.* **1978**, *27*, 357–365. [CrossRef] [PubMed]
96. 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.* **2010**, *84*, 4229–4242. [CrossRef] [PubMed]
97. Andréoletti, L.; Hober, D.; Becquart, P.; Belaich, S.; Copin, M.C.; Lambert, V.; Wattré, P. 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.* **1997**, *52*, 206–214. [CrossRef]
98. Brunner, J.E.; Ertel, K.J.; Rozovics, J.M.; Semler, B.L. Delayed kinetics of poliovirus RNA synthesis in a human cell line with reduced levels of hnRNP C proteins. *Virology* **2010**, *400*, 240–247. [CrossRef] [PubMed]
99. Kloc, A.; Rai, D.K.; Rieder, E. The Roles of Picornavirus Untranslated Regions in Infection and Innate Immunity. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 485. [CrossRef]
100. Chase, A.J.; Daijogo, S.; Semler, B.L. Inhibition of Poliovirus-Induced Cleavage of Cellular Protein PCBP2 Reduces the Levels of Viral RNA Replication. *J. Virol.* **2014**, *88*, 3192–3201. [CrossRef]
101. Dave, P.; George, B.; Sharma, D.K.; Das, S. Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) and PTB-associated splicing factor in CVB3 infection: An ITAF for an ITAF. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 9068–9084. [CrossRef]
102. Hunt, S.L.; Hsuan, J.J.; Totty, N.; Jackson, R.J. unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 437–448. [CrossRef]
103. Ray, P.S.; Das, S. La autoantigen is required for the internal ribosome entry site-mediated translation of Coxsackievirus B3 RNA. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4500–4508. [CrossRef] [PubMed]
104. Lawrence, P.; Schafer, E.A.; Rieder, E. The nuclear protein Sam68 is cleaved by the FMDV 3C protease redistributing Sam68 to the cytoplasm during FMDV infection of host cells. *Virology* **2012**, *425*, 40–52. [CrossRef] [PubMed]
105. Rai, D.K.; Lawrence, P.; Kloc, A.; Schafer, E.; Rieder, E. Analysis of the interaction between host factor Sam68 and viral elements during foot-and-mouth disease virus infections. *Virol. J.* **2015**, *12*, 224. [CrossRef] [PubMed]
106. Cathcart, A.L.; Rozovics, J.M.; Semler, B.L. Cellular mRNA decay protein AUF1 negatively regulates enterovirus and human rhinovirus infections. *J. Virol.* **2013**, *87*, 10423–10434. [CrossRef]
107. Piñeiro, D.; Fernandez-Chamorro, J.; Francisco-Velilla, R.; Martinez-Salas, E. Gemin5: A Multitasking RNA-Binding Protein Involved in Translation Control. *Biomolecules* **2015**, *5*, 528–544. [CrossRef]

108. Francisco-Velilla, R.; Fernandez-Chamorro, J.; Ramajo, J.; Martinez-Salas, E. The RNA-binding protein Gemin5 binds directly to the ribosome and regulates global translation. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 8335–8351. [CrossRef]
109. Domingo, E.; Holland, J.J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*, 151–178. [CrossRef]
110. Domingo, E.; Martin, V.; Perales, C.; Escarmis, C. Coxsackieviruses and quasispecies theory: Evolution of enteroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *323*, 3–32. [CrossRef]
111. Mandary, M.B.; Masomian, M.; Poh, C.L. Impact of RNA Virus Evolution on Quasispecies Formation and Virulence. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*. [CrossRef]
112. Domingo, E.; Sheldon, J.; Perales, C. Viral Quasispecies Evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, *76*, 159–216. [CrossRef]
113. Chapman, N.M.; Kim, K.S. Persistent coxsackievirus infection: Enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *323*, 275–292. [PubMed]
114. Kim, K.-S.; Tracy, S.; Tapprich, W.; Bailey, J.; Lee, C.-K.; Kim, K.; Barry, W.H.; Chapman, N.M. 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.* **2005**, *79*, 7024–7041. [CrossRef] [PubMed]
115. 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* **2008**, *375*, 480–491. [CrossRef] [PubMed]
116. Bouin, A.; Nguyen, Y.; Wehbe, M.; Renois, F.; Fornes, P.; Bani-Sadr, F.; Metz, D.; Andreoletti, L. Major Persistent 5′ Terminally Deleted Coxsackievirus B3 Populations in Human Endomyocardial Tissues. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1488–1490. [CrossRef] [PubMed]
117. Xu, J.; Sun, Y.; Li, Y.; Ruthel, G.; Weiss, S.R.; Raj, A.; Beiting, D.; López, C.B. Replication defective viral genomes exploit a cellular pro-survival mechanism to establish paramyxovirus persistence. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 799. [CrossRef] [PubMed]
118. Sidhu, M.S.; Crowley, J.; Lowenthal, A.; Karcher, D.; Menonna, J.; Cook, S.; Udem, S.; Dowling, P. Defective measles virus in human subacute sclerosing panencephalitis brain. *Virology* **1994**, *202*, 631–641. [CrossRef]
119. Dimmock, N.J.; Easton, A.J. Defective Interfering Influenza Virus RNAs: Time To Reevaluate Their Clinical Potential as Broad-Spectrum Antivirals? *J. Virol.* **2014**, *88*, 5217–5227. [CrossRef]
120. Manzoni, T.B.; López, C.B. Defective (interfering) viral genomes re-explored: Impact on antiviral immunity and virus persistence. *Future Virol.* **2018**, *13*, 493–503. [CrossRef]
121. Vignuzzi, M.; López, C.B. Defective viral genomes are key drivers of the virus-host interaction. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 1075–1087. [CrossRef]
122. Poirier, E.Z.; Mounce, B.C.; Rozen-Gagnon, K.; Hooikaas, P.J.; Stapleford, K.A.; Moratorio, G.; Vignuzzi, M. Low-Fidelity Polymerases of Alphaviruses Recombine at Higher Rates To Overproduce Defective Interfering Particles. *J. Virol.* **2016**, *90*, 2446–2454. [CrossRef]
123. Tapia, K.; Kim, W.; Sun, Y.; Mercado-López, X.; Dunay, E.; Wise, M.; Adu, M.; López, C.B. Defective Viral Genomes Arising In Vivo Provide Critical Danger Signals for the Triggering of Lung Antiviral Immunity. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*. [CrossRef]
124. Domingo, E.; Martin, V.; Perales, C.; Grande-Pérez, A.; García-Arriaza, J.; Arias, A. Viruses as quasispecies: Biological implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2006**, *299*, 51–82. [CrossRef] [PubMed]
125. Liu, Z.; Carthy, C.M.; Cheung, P.; Bohunek, L.; Wilson, J.E.; McManus, B.M.; Yang, D. Structural and functional analysis of the 5′ untranslated region of coxsackievirus B3 RNA: In vivo translational and infectivity studies of full-length mutants. *Virology* **1999**, *265*, 206–217. [CrossRef] [PubMed]
126. Roehl, H.H.; Parsley, T.B.; Ho, T.V.; Semler, B.L. Processing of a cellular polypeptide by 3CD proteinase is required for poliovirus ribonucleoprotein complex formation. *J. Virol.* **1997**, *71*, 578–585. [CrossRef]
127. Kato, H.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Yoneyama, M.; Yamamoto, M.; Matsui, K.; Uematsu, S.; Jung, A.; Kawai, T.; Ishii, K.J.; et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **2006**, *441*, 101–105. [CrossRef] [PubMed]
128. Loo, Y.-M.; Fornek, J.; Crochet, N.; Bajwa, G.; Perwitasari, O.; Martinez-Sobrido, L.; Akira, S.; Gill, M.A.; García-Sastre, A.; Katze, M.G.; et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J. Virol.* **2008**, *82*, 335–345. [CrossRef]
129. Kuo, R.-L.; Kao, L.-T.; Lin, S.-J.; Wang, R.Y.-L.; Shih, S.-R. MDA5 plays a crucial role in enterovirus 71 RNA-mediated IRF3 activation. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63431. [CrossRef]

130. Feng, Q.; Hato, S.V.; Langereis, M.A.; Zoll, J.; Virgen-Slane, R.; Peisley, A.; Hur, S.; Semler, B.L.; van Rij, R.P.; van Kuppeveld, F.J.M. MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 1187–1196. [CrossRef]
131. Abe, Y.; Fujii, K.; Nagata, N.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Oshiumi, H.; Matsumoto, M.; Seya, T.; Koike, S. The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* **2012**, *86*, 185–194. [CrossRef]
132. Wang, J.P.; Cerny, A.; Asher, D.R.; Kurt-Jones, E.A.; Bronson, R.T.; Finberg, R.W. MDA5 and MAVS mediate type I interferon responses to coxsackie B virus. *J. Virol.* **2010**, *84*, 254–260. [CrossRef]
133. Feng, Q.; Langereis, M.A.; van Kuppeveld, F.J.M. Induction and suppression of innate antiviral responses by picornaviruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 577–585. [CrossRef] [PubMed]
134. Barral, P.M.; Morrison, J.M.; Drahos, J.; Gupta, P.; Sarkar, D.; Fisher, P.B.; Racaniello, V.R. MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* **2007**, *81*, 3677–3684. [CrossRef] [PubMed]
135. Mukherjee, A.; Morosky, S.A.; Delorme-Axford, E.; Dybdahl-Sissoko, N.; Oberste, M.S.; Wang, T.; Coyne, C.B. The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1001311. [CrossRef] [PubMed]
136. Barral, P.M.; Sarkar, D.; Fisher, P.B.; Racaniello, V.R. RIG-I is cleaved during picornavirus infection. *Virology* **2009**, *391*, 171–176. [CrossRef]
137. Lei, X.; Han, N.; Xiao, X.; Jin, Q.; He, B.; Wang, J. Enterovirus 71 3C inhibits cytokine expression through cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 complex. *J. Virol.* **2014**, *88*, 9830–9841. [CrossRef] [PubMed]
138. Maggioli, M.F.; Fernandes, M.H.V.; Joshi, L.R.; Sharma, B.; Tweet, M.M.; Noll, J.C.G.; Bauermann, F.V.; Diel, D.G. Persistent Infection and Transmission of Senecavirus A from Carrier Sows to Contact Piglets. *J. Virol.* **2019**, *93*. [CrossRef]
139. Reetoo, K.N.; Osman, S.A.; Illavia, S.J.; Cameron-Wilson, C.L.; Banatvala, J.E.; Muir, P. Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis: Biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 2755–2762. [CrossRef]
140. Tam, P.E.; Messner, R.P. Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: Viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. *J. Virol.* **1999**, *73*, 10113–10121. [CrossRef]
141. Andréoletti, L.; Bourlet, T.; Moukassa, D.; Rey, L.; Hot, D.; Li, Y.; Lambert, V.; Gosselin, B.; Mosnier, J.F.; Stankowiak, C.; et al. Enteroviruses can persist with or without active viral replication in cardiac tissue of patients with end-stage ischemic or dilated cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.* **2000**, *182*, 1222–1227. [CrossRef]
142. Lévêque, N.; Renois, F.; Talmud, D.; Nguyen, Y.; Lesaffre, F.; Boulagnon, C.; Bruneval, P.; Fornes, P.; Andréoletti, L. 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**. [CrossRef]
143. Weber, F.; Wagner, V.; Rasmussen, S.B.; Hartmann, R.; Paludan, S.R. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5059–5064. [CrossRef] [PubMed]
144. Tracy, S.; Smithee, S.; Alhazmi, A.; Chapman, N. Coxsackievirus can persist in murine pancreas by deletion of 5′ terminal genomic sequences. *J. Med. Virol.* **2015**, *87*, 240–247. [CrossRef] [PubMed]
145. Alidjinou, E.K.; Engelmann, I.; Bossu, J.; Villenet, C.; Figeac, M.; Romond, M.-B.; Sané, F.; Hober, D. Persistence of Coxsackievirus B4 in pancreatic ductal-like cells results in cellular and viral changes. *Virulence* **2017**, *8*, 1229–1244. [CrossRef] [PubMed]
146. Lietzén, N.; Hirvonen, K.; Honkimaa, A.; Buchacher, T.; Laiho, J.E.; Oikarinen, S.; Mazur, M.A.; Flodström-Tullberg, M.; Dufour, E.; Sioofy-Khojine, A.-B.; et al. Coxsackievirus B Persistence Modifies the Proteome and the Secretome of Pancreatic Ductal Cells. *iScience* **2019**, *19*, 340–357. [CrossRef] [PubMed]
147. Jaïdane, H.; Caloone, D.; Lobert, P.-E.; Sane, F.; Dardenne, O.; Naquet, P.; Gharbi, J.; Aouni, M.; Geenen, V.; Hober, D. Persistent infection of thymic epithelial cells with coxsackievirus B4 results in decreased expression of type 2 insulin-like growth factor. *J. Virol.* **2012**, *86*, 11151–11162. [CrossRef]
148. Meertens, L.; Hafirassou, M.L.; Couderc, T.; Bonnet-Madin, L.; Kril, V.; Kümmerer, B.M.; Labeau, A.; Brugier, A.; Simon-Loriere, E.; Burlaud-Gaillard, J.; et al. FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. *Nature* **2019**. [CrossRef]

149. Daffis, S.; Szretter, K.J.; Schriewer, J.; Li, J.; Youn, S.; Errett, J.; Lin, T.-Y.; Schneller, S.; Zust, R.; Dong, H.; et al. 2′-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* **2010**, *468*, 452–456. [CrossRef]
150. Dai, Q.; Moshitch-Moshkovitz, S.; Han, D.; Kol, N.; Amariglio, N.; Rechavi, G.; Dominissini, D.; He, C. Nm-seq maps 2′-O-methylation sites in human mRNA with base precision. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 695–698. [CrossRef]
151. Züst, R.; Cervantes-Barragan, L.; Habjan, M.; Maier, R.; Neuman, B.W.; Ziebuhr, J.; Szretter, K.J.; Baker, S.C.; Barchet, W.; Diamond, M.S.; et al. Ribose 2′-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 137–143. [CrossRef]
152. 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* **2017**, *21*, 661–669. [CrossRef]
153. Lichinchi, G.; Zhao, B.S.; Wu, Y.; Lu, Z.; Qin, Y.; He, C.; Rana, T.M. Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 666–673. [CrossRef] [PubMed]
154. Szretter, K.J.; Daniels, B.P.; Cho, H.; Gainey, M.D.; Yokoyama, W.M.; Gale, M.; Virgin, H.W.; Klein, R.S.; Sen, G.C.; Diamond, M.S. 2′-O methylation of the viral mRNA cap by West Nile virus evades ifit1-dependent and -independent mechanisms of host restriction in vivo. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002698. [CrossRef] [PubMed]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Annexe 5 : L'autopsie : indispensable pour la connaissance et la prévention de la mort subite cardiaque.

Annales de pathologie 41 (2021) 85—96

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com



CAS ANATOMOCLINIQUE

L'autopsie : indispensable pour la connaissance et la prévention de la mort subite cardiaque

Autopsies are essential for a better knowledge and prevention of sudden cardiac death

Paul Fornès*, Domitille Callon

Laboratoire de biopathologie, hôpital Robert-Debré, institut-médico-légal, CHU, avenue du Général-Koenig, 51100 Reims, France

Accepté pour publication le 21 septembre 2020
Disponible sur Internet le 4 janvier 2021

MOTS CLÉS
Mort subite ;
Cœur ;
Autopsie ;
Histopathologie ;
Génétique ;
Virologie ;
Médecine légale

Résumé En France, la mort subite cardiaque (MSC) représente environ 30 000 à 50 000 décès par an. La MSC, tous âges et sexes confondus, est due à une maladie coronaire athéroscléreuse dans plus de 80 % des cas. En revanche, chez le sujet jeune (< 35 ans), les causes de MSC sont variées : génétiques, malformatives, infectieuses, toxiques, immunologiques... Dans cette population, il est donc important d'établir précisément la cause du décès afin de prévenir d'autres MSC chez les apparentés. La détermination de la cause du décès chez le cas index doit reposer sur une approche pluridisciplinaire. Cet article examine les différents aspects des autopsies et des investigations complémentaires : histologie, toxicologie, génétique, virologie, biochimie. Six observations illustrent l'importance de cette démarche pluridisciplinaire. Il existe deux catégories d'autopsies : judiciaire et médicale. Leur point commun est la recherche de la cause du décès. En revanche, plusieurs aspects les distinguent. Une autopsie judiciaire est ordonnée par un magistrat dans le cadre d'une enquête judiciaire à la suite d'un « obstacle médico-légal » mentionné dans le certificat de décès. Au cours des autopsies, des prélèvements sont effectués et placés sous scellés, mais c'est le magistrat qui décide si des analyses complémentaires doivent être ordonnées. Le médecin légiste intervient en tant qu'auxiliaire de la justice, mais il est donc confronté à la difficulté de faire valoir son rôle en matière de santé publique, pourtant essentiel. Les autopsies médicales, pratiquées par des pathologistes, sont demandées par des médecins cliniciens. Ces autopsies doivent respecter les exigences de recherche du consentement. Toutes les analyses utiles sont effectuées, ce qui permet un diagnostic précis par une approche pluridisciplinaire. L'histologie est indispensable, complétée parfois par immunohistochimie pour préciser des infiltrats inflammatoires (CD3, CD68). Les myocardites virales sont parmi les causes les plus fréquentes de MSC chez le

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : pfornes@chu-reims.fr (P. Fornès).

https://doi.org/10.1016/j.annpat.2020.09.008
0242-6498/© 2020 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

sujet jeune. Des analyses virologiques sont pratiquées à partir de prélèvements congelés, par biologie moléculaire. Des analyses toxicologiques et biochimiques peuvent s'avérer utiles. Le concept d'« autopsie moléculaire » souligne l'importance des analyses génétiques chez le cas index jeune. La cardiomyopathie hypertrophique et la cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène sont les causes génétiques les plus fréquentes chez le sujet jeune. Cette approche pluridisciplinaire est donc indispensable pour une meilleure connaissance et la prévention des MSC.
© 2020 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS
Sudden death;
Heart;
Autopsy;
Histopathology;
Genetics;
Virology;
Forensics

Summary In France, the incidence of sudden cardiac deaths (SCD) is approximately 30,000—50,000 per year. In the whole population, their cause is an atherosclerotic coronary disease in more than 80 % of cases, but in the young (< 35 years old), causes are various, including genetic, infectious, toxic, congenital anomalies, immune...Therefore a multidisciplinary approach is required for a better knowledge and prevention of SCD. In this article, we examine different aspects of autopsies and complementary investigations: histopathology, toxicology, biochemistry, genetics and virology. Six cases illustrate the importance of a multidisciplinary approach. There are two categories of autopsies: medicolegal or medical. Medicolegal autopsies are requested by a judicial authority when a death is considered suspicious. These autopsies are performed by forensic doctors. Most of them are not pathologists. During the autopsies, blood and tissue samples are taken, but analyses are done only at the request of the judicial authority if the analyses are useful for the truth. Consequently, the cause of death can remain uncertain. Medical autopsies are performed by a pathologist at the request of a clinician. The family consent is required. Useful analyses are performed, which is essential for the determination of a precise cause of death. In the young, ''molecular autopsy'', in addition to histology and other analyses, is essential in preventing genetic causes of SCD.
© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Selon l'OMS, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde, la deuxième en France (première pour les femmes) après les cancers [1]. Elles représentent environ 17 millions de décès par an [1]. Environ 25 % sont des morts subites cardiaques (MSC) [1]. Aux États-Unis, le nombre de MSC est d'environ 300—350 000 par an, estimation similaire en Europe [2—4]. En France, la MSC représente environ 30 000 à 50 000 décès par an [5]. Force est donc de constater qu'en dépit des progrès considérables en matières diagnostique et thérapeutique des maladies cardiovasculaires, la MSC est un problème important de santé publique. Une des difficultés dans la prévention de la MSC est le fait que deux tiers environ de ces MSC surviennent chez des personnes n'ayant aucun antécédent cardiovasculaire connu [6]. En outre, la variabilité des estimations est en partie liée à des définitions variées de la MSC [5—8]. La mort subite devrait être définie comme une mort naturelle inattendue survenue dans l'heure qui suit l'apparition d'éventuels symptômes [5—8]. Ce délai d'une heure entre d'éventuels symptômes et le décès est celui également retenu dans le nouveau certificat de décès (arrêté du 17 juillet 2017) qui a introduit la mention « mort subite » dans la rubrique « informations complémentaires » du volet médical afin d'améliorer les statistiques de mortalité.

La MSC, tous âges et sexes confondus, est due à une maladie coronaire athéroscléreuse dans plus de 80 % des cas [5]. Des facteurs de risque sont identifiés, des méthodes diagnostiques et thérapeutiques codifiées [5]. En revanche, chez le sujet jeune (moins de 35 ans), les causes de MSC sont plus variées : génétiques, malformatives, infectieuses, toxiques, immunologiques [6,9—11] ... Dans cette population, il est donc important d'établir précisément la cause du décès afin de prévenir d'autres MSC chez les apparentés. La détermination de la cause du décès chez le cas index doit reposer sur une approche pluridisciplinaire : autopsie, anatomopathologie, toxicologie, biochimie, génétique, virologie. La biologie moléculaire a notamment acquis une place importante, ce qui a conduit au concept d'« autopsie moléculaire » [12—14]. Force malheureusement est de constater que les autopsies sont peu pratiquées et que, lorsqu'elles le sont, des analyses complémentaires sont rarement effectuées. Pourtant, dans son rapport daté du 7 avril 2015, l'Académie nationale de médecine rappelait en préambule : « contribuant au progrès médical, à l'épidémiologie et à la prise de précautions indispensables, l'autopsie a été considérée comme un indice de qualité des soins et un élément de la veille sanitaire [15]. » Plusieurs études ont également souligné l'importance de l'autopsie pour corriger des diagnostics ante-mortem erronés. Ce taux de corrections est estimé à 20—25 % [16,17].

Cet article examine les différents aspects des autopsies et des investigations complémentaires. Six observations illustrent l'importance de cette démarche pluridisciplinaire.

Annales de pathologie 41 (2021) 85—96

Cadres juridiques des autopsies

Il existe deux catégories d'autopsies : judiciaire et médicale. Leur point commun est la recherche de la cause du décès. En revanche, plusieurs aspects les distinguent.

Autopsies judiciaires

Une autopsie judiciaire est ordonnée dans le cadre d'une enquête judiciaire diligentée par le procureur de la République, en application des articles 60, 74, 77-1 du Code de procédure pénale (CPP) ou beaucoup plus rarement d'une information judiciaire par un juge d'instruction, en application des articles 156 et suivants du CPP.

À l'origine d'une enquête judiciaire, le médecin qui a constaté le décès a coché la case « obstacle médico-légal » du certificat de décès, et en conséquence a avisé un officier de police judiciaire du commissariat ou de la gendarmerie. À cet égard, le nouveau certificat de décès précise les motifs d'obstacle médico-légal, dont la mort subite (hormis la mort inexpliquée du nourrisson). Les motifs d'obstacle médico-légal ne sont plus seulement représentés par les morts suspectes, c'est-à-dire des décès pouvant engager la responsabilité d'un tiers, donc avoir leur source dans une infraction, mais également par des décès de cause inconnue telle qu'une mort subite.

En vertu de l'article 74 du CPP, « en cas de découverte d'un cadavre, qu'il s'agisse ou non d'une mort violente, mais si la cause en est inconnue ou suspecte l'officier de police judiciaire qui en est avisé en informe immédiatement le procureur de la République, se transporte sans délai sur les lieux et procède aux premières constatations. Le procureur de la République se rend sur place s'il le juge nécessaire et se fait assister de personnes capables d'apprécier la nature des circonstances du décès…» Une enquête aux fins de recherche des causes de la mort est ouverte. Le corps est mis à la disposition de la justice. En conséquence, les opérations funéraires sont suspendues jusqu'à autorisation donnée par l'autorité judiciaire.

En vertu de l'article 60 du CPP, l'officier de police judiciaire a recours à toutes personnes capables et qualifiées afin de procéder à des constatations et des examens techniques ou scientifiques. Un médecin légiste est donc requis par l'autorité judiciaire. Il intervient initialement sur les lieux de la découverte du corps pour procéder à un examen externe du cadavre dans le cadre d'opérations dites de levée de corps. Au regard de ses constatations et des données de l'enquête le procureur de la République décide d'ordonner ou non une autopsie judiciaire. Les ayants-droit ne peuvent pas s'opposer à cette autopsie. La mission du médecin légiste requise aux fins d'autopsie est en général rédigée en ces termes : « rechercher les causes et circonstances du décès, rechercher tout indice de crimes ou de délits et faire toutes remarques utiles à la manifestation de la vérité. » En tant qu'auxiliaire de la justice, le médecin légiste a donc comme objectif principal la recherche d'indices de crimes ou de délits, c'est-à-dire la recherche de l'implication d'un tiers.

Le médecin légiste est un praticien titulaire d'un diplôme permettant la pratique des autopsies judiciaires : DESC de « médecine légale et expertises médicales », capacité de « pratiques médico-judiciaires ». La réforme du 3e cycle des études médicales de 2017 a créé un DES de « médecine légale et expertises médicales » qui permettra aux futurs titulaires de ce diplôme d'exercer la médecine légale avec la qualification de médecin légiste.

Les autopsies judiciaires sont pratiquées dans des instituts médico-légaux qui ont été créés dans le cadre de la circulaire du 27 décembre 2010 « relative à la mise en œuvre de la réforme de la médecine légale ». Nous soulignons dans cette réforme les termes de « reconnaissance de la médecine légale comme mission de service public. ».

Au cours de l'autopsie, en vertu de l'article 230-28 du CPP, « le praticien désigné à cette fin procède aux prélèvements biologiques qui sont nécessaires aux besoins de l'enquête ou de l'information judiciaire. » Les prélèvements sont placés sous scellés. Le médecin légiste informe l'autorité judiciaire de l'utilité de certaines analyses complémentaires, mais ce sont le procureur de la République ou le juge d'instruction qui décident si des analyses complémentaires doivent être ordonnées. Leur finalité est exclusivement la manifestation de la vérité judiciaire.

L'article 230-29 du CPP dispose qu'après l'autopsie « le praticien ayant procédé à une autopsie judiciaire est tenu de s'assurer de la meilleure restauration possible du corps, avant sa remise aux proches du défunt. ».

Le médecin légiste rédige un rapport qui est adressé exclusivement à l'autorité judiciaire. Les ayants-droit ont toutefois la possibilité de demander une copie de ce rapport au procureur de la République. Cette démarche peut être longue et complexe. Il est donc à noter que le médecin légiste n'a pas de contact direct avec les proches du défunt, en vertu du secret professionnel en matière judiciaire. Un éventuel entretien pour leur apporter des informations relatives à la cause du décès et leur proposer une enquête familiale dans le contexte d'une maladie génétique, nécessite l'autorisation de l'autorité judiciaire. Cette démarche peut être complexe, voire impossible lorsque l'affaire n'est pas classée sans suite, c'est-à-dire est en cours d'instruction.

Au regard des dispositions juridiques qui encadrent la pratique des autopsies judiciaires, le médecin légiste est donc confronté à la difficulté de faire valoir son rôle en matière de santé publique, pourtant essentiel. Conformément aux dispositions du nouveau certificat de décès, une mort subite est un motif d'obstacle médico-légal, donc d'ouverture d'une enquête judiciaire. À l'issue de la levée de corps, le magistrat et lui seul décide de faire pratiquer ou non une autopsie. Sa décision est guidée exclusivement par la recherche d'indices de crime ou de délit, en raison d'éventuels éléments suspects constatés sur les lieux par les enquêteurs et/ou le médecin légiste. En dehors de circonstances suspectes, l'obstacle médico-légal est levé, et en conséquence, le corps est rendu à la famille après classement sans suite, sans autopsie.

Il est important de savoir qu'une autopsie médicale peut être alors proposée à la famille, comme nous l'expliquerons dans le prochain chapitre, mais son organisation est compliquée. Ces autopsies médicales que nous préconisons sont malheureusement exceptionnelles.

Compte tenu de l'objectif des enquêtes judiciaires, la recherche d'indices de crimes ou de délits, les autopsies judiciaires ne sont pas systématiquement complétées par des analyses anatomo-pathologiques, toxicologiques, microbiologiques ou génétiques. Le magistrat et lui seul décide de faire pratiquer ou non des analyses complémentaires. Sa décision est guidée par sa recherche d'indices de crime ou de délit. Si le médecin légiste conclut à l'issue de son autopsie judiciaire à une mort subite « probablement » d'origine cardiaque, sans indice d'implication d'un tiers, le magistrat décidera le plus souvent un classement sans suite et délivrera le permis d'inhumer, autorisant les opérations

funéraires. Les analyses ne seront pas pratiquées et la cause de la mort restera incertaine. Il est important de savoir qu'elles peuvent être toutefois effectuées dans un cadre médical à la demande des ayants-droit, avec l'accord du magistrat. Rares sont les familles qui connaissent cette possibilité. Cette procédure est complexe, de nature à les faire renoncer à ces investigations complémentaires : demande de bris de scellé auprès du procureur de la République, coût pour les familles, notamment.

Force est donc de constater les difficultés pour concilier les pratiques judiciaires et les besoins en matière de santé publique. Pourtant, dans environ 20—25 % des décès le diagnostic ante-mortem est remis en cause après l'autopsie [15—17]. Cette proportion s'élève lorsque des analyses complémentaires sont pratiquées. L'absence d'investigations approfondies est un obstacle à la prévention de la MSC, notamment chez les sujets jeunes, dont les pathologies sont souvent génétiques.

Autopsies médicales

Tandis que les autopsies judiciaires concernent dans une large majorité des cas des décès extrahospitaliers, les autopsies médicales sont pratiquées en règle générale à la demande de médecins référents de patients hospitalisés décédés de cause inconnue. Souvent, ces décès sont inattendus. Un exemple est celui d'un patient dont l'état de santé semble s'améliorer, voire autorise sa sortie, mais découvert décédé sur son lit ou au sol dans sa chambre.

Il est à noter qu'un médecin n'est pas tenu de faire droit à la demande des proches de faire pratiquer une autopsie, même lorsque la cause du décès est incertaine. Toutefois, nous pensons que les médecins devraient approuver ces demandes dans le respect du devoir d'information aux ayants-droit relative à la cause d'un décès. S'agissant des patients, le devoir d'information est souligné dans le Code de déontologie médicale (article 35) et la loi du 4 mars 2002 « relative aux droits des malades et à la qualité du système de santé. » En ce qui concerne les ayants-droit, le devoir d'information est limité à la cause du décès. Ce droit leur permet, d'une part, de faire valoir leurs droits juridiques (assurances, accident du travail, maladies professionnelles...), et d'autre part, de bénéficier d'enquêtes familiales dans le cadre de pathologies éventuellement génétiques.

La pratique des autopsies médicales est régie par la loi de bioéthique du 6 août 2004. Les dispositions légales sont contenues dans le Code de santé publique (CSP). Les autopsies médicales ne sont possibles qu'en l'absence d'obstacle médico-légal. En vertu de l'article L 1211-2 du CSP « les autopsies sont dites médicales lorsqu'elles sont pratiquées en dehors du cadre de mesures d'enquêtes ou d'instructions diligentées lors d'une procédure judiciaire, dans le but d'obtenir un diagnostic sur les causes du décès. Elles doivent être pratiquées conformément aux exigences de recherche du consentement. ».

En vertu de l'article L. 1232-1 du CSP « le médecin informe les proches du défunt préalablement au prélèvement envisagé, de sa nature et de sa finalité... Ce prélèvement doit être pratiqué sur une personne majeure dès lors qu'elle n'a pas fait connaître de son vivant son refus d'un tel prélèvement principalement par l'inscription sur un registre national automatisé prévu à cet effet... L'Agence de la biomédecine est avisée préalablement à sa réalisation de tout prélèvement à des fins thérapeutiques et à des fins scientifiques. ».

L'interrogation du registre national automatisé des refus à l'agence de la biomédecine est nécessaire pour toutes les personnes âgées de plus de 13 ans. Pour les autres mineurs l'autorisation des parents ou du tuteur légal est nécessaire par écrit.

Le devoir d'information des proches a entraîné un glissement de la présomption de consentement vers le devoir d'obtenir un consentement à l'autopsie par les proches. Les hôpitaux ont créé un formulaire de consentement qui doit être présenté à un proche pour autorisation signée. Seulement dans le cas où aucun proche ne peut être trouvé après des recherches, l'autopsie médicale peut être pratiquée.

Lorsque le décès survient dans un établissement de santé ne disposant pas de l'infrastructure permettant des autopsies médicales, le corps est transporté dans un CHU. Des conventions entre les CHU et les autres établissements de santé (privés ou publics), permettent ces autopsies en prenant en compte notamment les aspects budgétaires.

Les autopsies médicales peuvent être également demandées par un médecin constatant un décès au domicile, avec le consentement des proches. Nous avons précédemment indiqué la circonstance d'une levée d'obstacle médico-légal après examen externe du corps par un médecin légiste requis par l'autorité judiciaire. Le médecin qui constate le décès à domicile peut aussi proposer une autopsie médicale s'il ne juge pas utile de cocher la case obstacle médico-légal, mais souhaite donner aux proches une information claire sur la cause du décès. Ce médecin, en règle générale le médecin traitant, ne coche pas la case obstacle médico-légal, car il connaît bien la famille. Les proches doivent être informés que les frais d'autopsie sont à la charge de l'établissement de santé recevant le corps, mais l'établissement de santé n'étant pas obligé de prendre en charge les frais de transport du corps, que ces derniers sont à la charge de la famille.

Les autopsies médicales sont pratiquées dans une large majorité des cas par des anatomo-pathologistes mais elles peuvent être pratiquées par d'autres praticiens, notamment des médecins légistes dans certains centres.

Dans tous les cas, la famille doit être informée de l'article R. 2213-11 du Code général des collectivités territoriales selon lequel « les opérations de transport de corps avant mise en bière du corps d'une personne décédée sont assurées dans un délai maximum de 48 h à compter du décès. » En d'autres termes, en cas de demande d'autopsie médicale, le médecin doit s'assurer que cette autopsie ne retardera pas le transport du corps sans mise en bière depuis le CHU vers un funérarium choisi par la famille pour l'organisation des obsèques. Au-delà de ces 48 h, la mise en bière devra se faire dans le CHU où a été pratiquée l'autopsie. Un allongement dérogatoire du délai à 72 h concerne certaines infections, mais pas les morts subites.

L'article L. 1232-5 du CSP dispose que « les médecins ayant procédé à des prélèvements ou à une autopsie médicale sur une personne décédée sont tenus d'assurer la meilleure restauration possible du corps. ».

Méthodologie autopsique

Une autopsie médicale ou judiciaire doit être complète. Notamment, la constatation de lésions cardiaques n'est pas suffisante pour établir un lien avec la cause du décès. En cardiologie, il n'existe pas de corrélation étroite entre la sévérité de certaines lésions cardiaques et la gravité de leur expression clinique. Les mêmes lésions cardiaques peuvent être asymptomatiques chez un individu, mais entraîner la

Annales de pathologie 41 (2021) 85—96

mort d'un autre. La détermination de la cause du décès doit donc s'appuyer sur l'interprétation d'un syndrome lésionnel pluriviscéral nécessitant l'analyse macroscopique et histologique de l'ensemble des organes, ainsi que d'éventuelles autres analyses complémentaires que nous examinerons.

Nous ne détaillerons pas dans le cadre des objectifs de cet article les spécificités et problématiques des analyses macro et histologiques des viscères autres que le cœur.

Examen macroscopique du cœur

Le cœur est un organe complexe, non seulement d'un point de vue anatomique, mais également fonctionnel, ayant des activités mécaniques et électriques sous la dépendance de systèmes neurohormonaux locaux et systémiques. Les cliniciens attendent donc de la part des pathologistes, une « anatomie pathologique fonctionnelle » du cœur.

Afin de corréler les constatations anatomo-pathologiques aux données des investigations cliniques, électrophysiologiques et de l'imagerie, il est important d'utiliser une terminologie topographique en lien avec ces autres données. Le cœur a une orientation complexe. De manière simplifiée, on distingue les parois antérieure, postérieure (ou inférieure ou postéro-diaphragmatique) et latérale du ventricule gauche (VG), les parois antérieure, latérale et postérieure du ventricule droit (VD). Le septum interventriculaire est individualisé.

Le cœur doit être disséqué et examiné à l'état frais, mais les prélèvements pour l'examen histologique doivent être effectués après fixation formolée du cœur entier. Il faut proscrire des prélèvements d'échantillons pour l'histologie.

Il n'existe pas une seule bonne technique de dissection. Celle-ci doit s'adapter aux questions que l'on se pose. Nous décrivons une technique qui, à la lumière de notre expérience, et en raison de la fréquence relative des différentes pathologies, permet d'obtenir le plus d'informations en pratique courante. Après l'examen du péricarde, nous examinons les artères coronaires épicardiques puis, en se basant sur le flux sanguin, les cavités et les appareils valvulaires.

Péricarde

L'ouverture du péricarde aux ciseaux permet parfois de recueillir environ 10 mL d'un liquide clair physiologique. La cavité péricardique est bordée par l'épicarde, surface du cœur qui constitue le feuillet viscéral de la séreuse, et le feuillet pariétal, tissu conjonctivo-adipeux. L'interprétation d'un éventuel épanchement doit être prudente car le retentissement hémodynamique dépend, non seulement de son volume, mais également et surtout de la rapidité de sa constitution.

Artères coronaires épicardiques

Il est préférable de commencer l'examen macroscopique du cœur par la dissection des artères coronaires épicardiques, car les incisions au couteau effectuées pour l'examen des cavités sont susceptibles de couper ces artères de façon inadéquate, tangentiellement, et de gêner l'examen ultérieur de ces artères. Deux règles doivent être respectées impérativement : la première est de proscrire la coronographie post-mortem avec injection de produit de contraste. L'introduction d'un trocart dans l'ostium coronaire et l'injection de produit de contraste sous pression peuvent décoller d'éventuelles thromboses, modifier l'aspect de plaques athéroscléreuses, créer des dissections artéfactuelles. Les « images d'arrêt » n'apportent aucune information supplémentaire par rapport à celles obtenues par des sections transversales étagées. La seconde règle est de proscrire l'ouverture longitudinale des artères coronaires épicardiques aux ciseaux. Les ciseaux introduits dans ces artères vont immanquablement léser leur surface, altérer l'aspect de plaques athéroscléreuses, écraser ou décoller d'éventuelles thromboses. Enfin, il sera impossible d'évaluer le degré de sténose de l'artère ouverte longitudinalement. Les artères coronaires épicardiques doivent être examinées par des coupes transversales étagées espacées de 3 mm environ, effectuées au bistouri. Lorsque des calcifications rendent impossibles ces coupes transversales, l'artère doit être excisée en totalité de la graisse épicardique et mise à décalcifier pour 24 à 48 h, après fixation.

On décrit deux réseaux coronaires, droit et gauche. L'artère coronaire droite (CD) naît de l'aorte par un ostium situé dans le sinus de Valsalva de la cusp dite coronaire droite. La CD chemine dans la graisse épicardique le long du sillon atrioventriculaire droit. Le plus souvent, le réseau droit est dominant, ce qui indique que la CD se prolonge jusqu'à la face postérieure du VG, où elle se continue par l'artère interventriculaire postérieure (IVP), qui chemine le long du sillon du même nom vers l'apex. La CD et l'IVP donnent plusieurs collatérales qui, en pratique courante, ne sont pas examinées par des coupes transversales.

Le réseau gauche débute par le tronc commun, dont l'ostium naît de l'aorte dans le sinus de Valsalva coronaire gauche. Le segment mesure environ 0,5 à 2 cm, mais il peut être absent : ses branches, l'artère interventriculaire antérieure (IVA) et l'artère circonflexe (Cx) peuvent naître directement de l'aorte. Après ce segment, le tronc commun se divise en ces deux artères : la Cx et l'IVA. Cette dernière chemine dans la graisse épicardique le long du sillon interventriculaire antérieur. Elle se termine au niveau de l'apex. Elle possède des artères collatérales épicardiques, notamment la première artère diagonale, et donne des artères perforantes à destinée intramyocardique, notamment septale. La Cx s'engage dès la division du tronc commun dans le sillon atrioventriculaire gauche. Ses collatérales comportent une branche à destinée atriale gauche et des branches ventriculaires gauches parmi lesquelles s'individualise nettement la première marginale gauche.

Dans le contexte d'une pathologie ischémique, il est important de connaître les territoires d'irrigation coronarienne. La CD irrigue l'oreillette droite, la cloison interatriale, le ventricule droit (VD), et la plus grande partie de la paroi inférieure gauche, sauf dans la région apicale. La face antérieure du VG est vascularisée essentiellement par l'IVA, la face latérale par le système des marginales gauches de la Cx, la face inférieure par les artères marginales basses et les diaphragmatiques nées, soit d'une Cx suffisamment longue, soit de la CD par une artère rétroventriculaire. Quant à la vascularisation du septum interventriculaire, elle est pour environ les deux tiers supérieurs sous la dépendance des artères septales perforantes de l'IVA et pour le tiers inférieur, sous la dépendance des septales ascendantes de l'IVP.

On définit une sténose significative comme une réduction de calibre de la lumière artérielle supérieure à 75 %. Cette limite est difficile à évaluer macroscopiquement. Nous effectuons de façon systématique des prélèvements des segments les plus sténosés pour examen histologique, qui permet une estimation plus précise du degré de sténose. Nous prélevons également les segments porteurs de plaques compliquées de thrombose ou d'hémorragie intraplaque.

Les artères coronaires épicardiques ont d'assez nombreuses variantes anatomiques [18]. Certaines particularités anatomiques peuvent être responsables de mort subite, mais l'interprétation doit être prudente. Toute autre cause de décès doit être éliminée avant d'incriminer une malformation congénitale coronarienne. Il faut noter que l'anomalie la plus fréquente est le pont myocardique qui intéresse l'IVA : son trajet, approximativement au tiers moyen, devient intramyocardique au lieu de rester épicardique, puis il redevient épicardique. Le pont a une longueur et une profondeur d'environ 10 mm. Ces ponts myocardiques peuvent se compliquer de mort subite, le plus souvent chez un sujet jeune.

Oreillettes

Le terme oreillette a été remplacé par celui d'atrium dans la nouvelle nomenclature anatomique, mais reste préféré en pratique clinique. En revanche, l'adjectif atrial est couramment utilisé : par exemple, fibrillation atriale est préférée à fibrillation auriculaire.

L'oreillette droite (OD) est ouverte en coupant sa paroi le long d'une ligne latérale droite qui unit les veines caves. L'oreillette gauche (OG) est ouverte en coupant la paroi joignant les orifices des veines pulmonaires. Le volume des oreillettes est évalué (normal ou dilaté), de même que l'épaisseur de leur paroi (normale ou épaissie).

Les muscles pectinés de l'auricule droite sont minutieusement examinés à la recherche d'un thrombus que l'on distinguera de caillots post-mortem en nettoyant la cavité sous un filet d'eau. Dans l'OD, la fenêtre ovale (ou fossa ovalis), mesurant environ 2—3 cm de diamètre, est examinée afin de rechercher une communication interatriale. Il est possible de trouver un petit pertuis (ou foramen ovale) de 1 à 2 mm, non pathologique. En cas de communication interatriale par septum secundum, forme la plus fréquente, on note le diamètre de l'orifice.

Dans l'OD, on ouvre longitudinalement le sinus coronaire. Il naît de la grande veine coronaire qui, depuis la pointe du cœur, monte parallèlement au trajet de l'IVA, dont elle est satellite.

Depuis l'OG, ouverte, on observe l'appareil valvulaire mitral. En cas d'aspect évocateur de prolapsus mitral (insuffisance mitrale dégénérative ou maladie de Barlow) un test à l'eau est pratiqué : après remplissage du VG par de l'eau, on comprime l'apex du VG, ce qui permet d'examiner grossièrement le jeu valvulaire, les deux feuillets se positionnant normalement pour empêcher le reflux d'eau. Un reflux indique un prolapsus avec insuffisance mitrale. Ce test permet également de rechercher d'éventuelles ruptures de cordages compliquant le prolapsus. Le prolapsus mitral est une cause rare de mort subite. Certaines formes sont génétiques.

L'auricule gauche est examinée à la recherche d'un thrombus.

Appareils valvulaires atrio-ventriculaires

Ils sont constitués de l'anneau, des feuillets valvulaires, des cordages et des piliers. Les constatations à l'examen de chacun des composants sont réunies en un syndrome lésionnel qui permet :

- d'établir un diagnostic de maladie valvulaire et ;
- d'évaluer, soit le retentissement de cette maladie valvulaire sur le reste du cœur, soit le retentissement d'une cardiopathie non valvulaire sur l'appareil valvulaire considéré.

Appareil valvulaire tricuspide

Il est ouvert au couteau le long du bord latéral du ventricule droit. Les caillots post-mortem sont minutieusement enlevés à la pince avec l'aide d'un filet d'eau. On vérifie la position anatomique de l'anneau tricuspide, qui est mesuré. Chez l'adulte, sa longueur varie de 10 à 12 cm de long. L'appareil valvulaire tricuspide comporte trois feuillets séparés par trois commissures. On distingue un feuillet antérieur, un feuillet septal et un feuillet postérieur. L'examen des feuillets comporte la recherche d'épaississements et de végétations. Les cordages sont amarrés sur les colonnes charnues du VD. Il n'existe pas de piliers individualisés.

Appareil valvulaire mitral

L'appareil valvulaire est ouvert au couteau le long du bord latéral du VG. La circonférence de l'anneau est d'environ 10 cm. L'anneau mitral est examiné à la recherche de calcifications. L'appareil valvulaire mitral comporte deux feuillets, le feuillet antérieur (ou feuillet aortique) et le feuillet postérieur, séparés par deux commissures. Le feuillet antérieur a une longueur d'environ 2 à 3 cm, mesurée entre l'anneau et le bord libre, et une largeur de 4 cm environ à sa base. Le feuillet postérieur est divisé en trois segments (nommés P1, P2 et P3) séparés par des petites incisures au niveau du bord libre. Ce feuillet a une largeur de 6 cm environ et son plus long segment en général le médian (P2) a une longueur moyenne de 1 cm. L'examen des feuillets comporte la recherche d'épaississements, de calcifications et de végétations. L'examen des commissures recherche des symphyses (fusions), éventuellement calcifiées. Les cordages sont amarrés sur des piliers appelés antérieurs ou antéro-latéraux et postérieurs ou postéro-médiaux qui peut avoir un à trois sommets. Les piliers sont situés à une hauteur variable, mais le plus souvent à la jonction du tiers basal et des deux tiers apicaux.

Appareil valvulaire pulmonaire

Il est ouvert au couteau que l'on engage dans la chambre de chasse du VD puis dans le tronc artériel pulmonaire. L'anneau mesure 8 cm de circonférence environ. Les trois cusps ont une longueur d'environ 1,5 en leur milieu. Le terme de cusp est préféré en cardiologie et chirurgie à celui de sigmoïde.

Appareil valvulaire aortique

Il est ouvert au couteau que l'on engage dans la chambre de chasse du VG puis dans l'aorte. L'incision suit le bord du septum. L'anneau mesure environ 8 cm de circonférence. Les anneaux de la valve aortique et de la valve mitrale sont fusionnés (fibrosa intervalvulaire) le long du segment d'attachement de la valve antérieure mitrale. On distingue une cusp non coronaire en position postérieure et deux cusps coronaires, l'une droite et l'autre gauche, antérieures. Les trois cusps ont un petit nodule au milieu de leur bord libre, appelé nodule d'Arantius, qui peut être fibreux, voire calcifié. Le bord libre peut présenter des aspects papillaires formant des excroissances de Lambl, qu'il faut différencier de fibroélastomes papillaires. Les cusps ont une longueur d'environ 2 cm sur leur ligne médiane, sont fines, transparentes et peuvent présenter de petites fenestrations à distinguer de perforations. L'examen des cusps comporte la recherche d'épaississements, de calcifications et de végétations. L'examen des commissures recherche des symphyses (fusions), éventuellement calcifiées. Le sinus de Valsalva,

Annales de pathologie 41 (2021) 85—96

portion de l'aorte en regard de chaque cusp doit être examiné à la recherche d'un anévrysme. On examine également le segment ascendant de l'aorte qui renseigne sur le fonctionnement de la valve aortique. En particulier, on recherche un anévrysme de ce segment ascendant.

Ventricules

Nous préconisons d'effectuer des coupes transversales étagées des ventricules, d'environ 2 cm d'épaisseur, en débutant à l'apex, avant l'ouverture des cavités. La coupe la plus basale est située au niveau des piliers de la valve mitrale, afin de ne pas sectionner les cordages. Cette technique permet d'évaluer le degré de dilatation des cavités ventriculaires, et d'obtenir une cartographie précise des lésions myocardiques, tels que des territoires d'infarctus ou de fibrose. On peut ainsi mieux définir la paroi où est localisée la lésion, décrire l'étendue entre l'apex et la base (tiers inférieur, tiers moyen, tiers basal), et la profondeur (lésion sous-endocardique, intra-murale, sous-épicardique ou transmurale). Le volume des cavités ventriculaires est évalué (normal ou dilaté). L'épaisseur des ventricules se mesure 2 cm environ sous les anneaux mitral et tricuspide. L'épaisseur normale de la paroi du VD est inférieure ou égale à 0,5 cm, sans mesurer les colonnes charnues, et celle du VG d'environ 1,5 cm (1 à 1,8 cm), sans mesurer les colonnes charnues et les piliers. Il est à noter qu'en cas de dilatation, la paroi du VG peut paraître amincie, alors que le poids du cœur est augmenté, en raison d'un effet de distension. On distingue, d'une part, les hypertrophies isolées (sans dilatation), symétriques, concentriques (HTA, rétrécissement aortique, principalement), ou bien asymétriques, compensatrices (d'un territoire d'infarctus), ou s'accompagnant d'une hypertrophie septale (cardiomyopathie hypertrophique), et d'autre part, les hypertrophies-dilatation. Dans le VD, on recherche une transformation adipeuse du myocarde dont on décrit la localisation, l'étendue entre l'apex et la base et la profondeur (transmurale). Cette transformation adipeuse fait suspecter une cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène qui doit être confirmée par l'examen histologique de plusieurs prélèvements. L'examen histologique permet de mieux localiser l'infiltration adipeuse et de rechercher une fibrose, dont la présence est nécessaire pour porter ce diagnostic. La surface endocardique des ventricules doit être examinée à la recherche de plages de fibrose. Leur présence traduit des troubles hémodynamiques, des turbulences, engendrés par exemple par une cardiopathie valvulaire. Sont décrites des lésions de jet, des lésions de frictions dues à des cordages, des lésions d'impacts dites en miroir du feuillet antérieur mitral sur le septum en cas de cardiomyopathie hypertrophique obstructive, etc. Rarement, il s'agit d'une fibrose endomyocardique. Elle est dans ce cas étendue, biventriculaire et a des caractéristiques histologiques à rechercher, notamment une élastose associée. Sur les tranches de section ventriculaire sont examinés les piliers de l'appareil valvulaire mitral à la recherche de fibrose et/ou de nécrose.

Après fixation formolée, nous effectuons de façon systématique au moins 4 prélèvements myocardiques au niveau des parois antérieures, latérales, inférieures et septales du VG et 2 au niveau de la paroi latérale du VD. Ces prélèvements sont effectués à des niveaux différents, du tiers basal au tiers apical. Nous complétons ces prélèvements systématiques par d'autres, guidés par les constatations lésionnelles.

Voies de conduction

Nous ne préconisons pas des prélèvements systématiques des voies de conduction. Ils doivent être justifiés par des indications particulières. L'interprétation des constatations histologiques est très difficile, nécessitant l'analyse de multiples coupes et une grande expérience pour savoir reconnaître les nombreux artéfacts et distinguer constatations physiologiques et pathologiques. Le pathologiste doit avoir à sa disposition des électrocardiogrammes, voire des données d'investigations rythmologiques spécialisées. Il faut noter que des lésions histologiques authentiques peuvent ne pas s'accompagner de troubles de conduction.

En revanche, nous soulignons l'importance de l'analyse des enregistrements des pacemakers et défibrillateurs implantables par les cardiologues après avoir été minutieusement prélevés lors de l'autopsie. Le pathologiste doit notamment examiner l'implantation des sondes et doit rechercher d'éventuels dépôts susceptibles d'indiquer des thromboses ou des végétations d'endocardite.

Poids du cœur

Le cœur nettoyé des caillots post-mortem est pesé à l'état frais à la fin de l'examen macroscopique. Le poids du cœur dépend du sexe, de la surface corporelle et du poids corporel, que l'on utilise comme référence [19]. Chez l'homme, de corpulence moyenne, le poids d'un cœur normal est inférieur à 400 g environ. Chez la femme, le poids d'un cœur normal est inférieur à 350 g environ.

Le poids du cœur est une donnée importante dans l'examen du cœur. Il a été montré dans des études épidémiologiques, notamment celle de Framingham, que l'hypertrophie ventriculaire gauche était un facteur de risque indépendant de MSC [20,21]. L'interprétation du poids du cœur est difficile : des valeurs reflétant une hypertrophie peuvent être proches de celles considérées normales. Il faut donc compléter le poids du cœur par les autres constatations macroscopiques du VG, notamment la forme du myocarde ventriculaire gauche (aspect asymétrique), l'existence d'une dilatation. L'augmentation du poids du cœur peut être physiologique chez le sportif. Ensuite, le pathologiste doit répondre à la question de savoir dans quelle cardiopathie s'inscrit cette augmentation du poids du cœur : hypertension artérielle, maladie coronaire, valvulopathie, cardiomyopathie primitive... L'interprétation des constatations macroscopiques s'appuie sur une confrontation avec les données hémodynamiques, électriques et biologiques fournies par les cliniciens. L'examen macroscopique est complété par des prélèvements pour examen histologique indispensable.

Examens complémentaires

Le diagnostic étiologique d'une MSC doit s'appuyer sur une approche pluridisciplinaire. Nous avons souligné que la constatation de lésions macroscopiques cardiaques ne suffit pas pour établir leur responsabilité dans la cause du décès.

Analyses histologiques

Elles doivent être systématiques. Nous avons indiqué que malheureusement elles sont relativement rares en cas d'autopsies judiciaires, notamment en cas de mort subite,

s'agissant de décès considérés non suspects d'un point de vue judiciaire. Nous avons souligné que ces analyses doivent être pluriviscérales. En ce qui concerne le cœur, nous avons détaillé les prélèvements indispensables (myocarde) et utiles dans certains cas (sections d'artères coronaires, valves).

En règle générale, la coloration HES est suffisante. La coloration des fibres élastiques par l'orcéine peut être utile en cas de suspicion de fibroélastose.

La constatation d'une inflammation mononucléée impose des analyses immunohistochimiques en utilisant les anticorps anti-CD3 et anti-CD68. En effet dans notre expérience, le seul examen histologique expose à une sous-estimation des infiltrats. Ces derniers doivent être quantifiés. Est considérée significative une inflammation comportant plus de 14 leucocytes/mm^2, représentés par des macrophages et au moins 7 lymphocytes T/mm^2. Une expression augmentée du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II dans les myocytes peut être aussi recherchée (anti-HLA-DR).

Analyses toxicologiques

Leur utilité est importante, non seulement dans un cadre judiciaire, en cas de décès extrahospitalier, mais également parfois dans le cadre médical d'un décès hospitalier. Dans notre expérience, dans de nombreux cas judiciaires, les analyses toxicologiques ont révélé des intoxications aiguës, alors que les constatations autopsiques orientaient vers une MSC. En milieu intra-hospitalier, certaines intoxications aiguës médicamenteuses peuvent être la conséquence de pathologies pharmacogénétiques, qui modifient le métabolisme de certaines molécules, en dépit de posologies prescrites normales. Des interactions médicamenteuses peuvent être également responsables de MSC. Ces MSC sont provoquées principalement par des arythmies ventriculaires par allongement du segment QT de l'ECG, dénommées torsades de pointe.

Du sang est prélevé dans une veine iliaque. Il faut éviter de prélever du sang dans les cavités cardiaques. Ce sang cardiaque subit en effet un phénomène de redistribution post-mortem des molécules qui fausse les dosages. En pratique médico-légale, les analyses toxicologiques sont également pratiquées dans l'urine, le contenu gastrique, la bile, parfois l'humeur vitrée et les cheveux. Ces autres matrices n'ont pas d'utilité en pratique autopsique médicale courante. Si les analyses ne sont pas pratiquées rapidement, les prélèvements sont congelés à −20 °C.

Analyses biochimiques

La fiabilité des analyses biochimiques post-mortem est aujourd'hui reconnue. Elles peuvent être par exemple d'une grande utilité pour le diagnostic d'une dyslipoprotéinémie génétique responsable d'une mort subite coronaire chez un sujet jeune. Nous ajoutons que ces analyses peuvent également révéler des troubles métaboliques ou hormonaux, notamment en rapport avec un diabète, connu ou non, à l'origine du décès. Les analyses biochimiques permettent ainsi le diagnostic différentiel entre un décès survenu dans le contexte d'un coma prolongé, et une MSC survenue pendant le sommeil.

Les analyses sont pratiquées à partir de sang veineux périphérique. Un prélèvement d'urine et d'humeur vitrée peuvent s'avérer utiles.

Autopsie moléculaire

Des prélèvements congelés sont indispensables, d'une part, pour les analyses microbiologiques notamment virologiques, et d'autre part, génétiques.

Analyses génétiques

Nous préconisons des prélèvements de rate en raison de sa richesse en cellules nucléées. Deux cryotubes contenant environ 1 mm^3 de rate, congelés à −80 °C sont suffisants.

Analyses virologiques

Nous préconisons 5 prélèvements, 2 en paroi libre du VG, 1 dans le septum et 2 dans le VD, d'environ 1 mm^3 chacun conservés congelés également à −20 ou au mieux à −80 °C. Les analyses virologiques sont effectuées par (transcriptase inverse)-réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR ou PCR). Les virus cardiotropes les plus fréquents sont les Entérovirus, le Parvovirus B19 (PVB19) et l'herpèsvirus de type 6 (HHV6). Dans notre expérience, et à partir des données de la littérature nous considérons indispensable la quantification des charges virales en complément de l'identification du virus car les virus peuvent être des « bystanders » notamment le PVB19 sans avoir d'effet cytopathogène significatif impliqué dans la mort subite [6,22].

Interprétation des constatations autopsiques et des résultats des examens complémentaires

Nous avons souligné l'importance d'une approche pluridisciplinaire. Une difficulté particulière est le diagnostic étiologique d'une mort subite *sine materia*, c'est-à-dire sans anomalies macroscopiques ni histologiques. Dans notre expérience, deux hypothèses diagnostiques doivent être envisagées.

Myocardites virales

Certaines formes fulminantes peuvent être la cause d'un décès sans inflammation cellulaire associée. L'infection virale entraîne « un orage cytokinique » non diagnostiqué à l'histologie. Les analyses virologiques par biologie moléculaire avec quantification de la charge virale sont indispensables au diagnostic.

Canalopathie

Une MSC *sine materia* doit faire suspecter une canalopathie. Ces maladies génétiques des canaux ioniques, syndrome du QT long, syndrome de Brugada, tachycardie cathécholaminergique... ne peuvent être diagnostiquées que par des analyses génétiques.

Il est important de noter que le diagnostic d'une myocardite virale n'exclut pas une canalopathie, qui doit donc être envisagée et recherchée chez les apparentés du cas index. Une myocardite peut en effet compliquer une canalopathie et augmenter ainsi le risque arythmogène.

Annales de pathologie 41 (2021) 85—96

Observations

Nous présentons six cas illustrant l'importance des autopsies et d'une approche pluridisciplinaire associée en matière de MSC.

Cas 1

Une adolescente de 15 ans est décédée subitement au cours d'une activité sportive scolaire. Dans ce contexte, une autopsie judiciaire a été ordonnée. L'autopsie a révélé une importante hypertrophie du VG, asymétrique (paroi libre du VG : 17 mm ; septum : 28 mm) (Fig. 1).

Histologiquement, cette hypertrophie s'associait à une désorganisation architecturale des cardiomyocytes, une fibrose et des dystrophies des artères intramyocardiques (Fig. 2).

L'hypertrophie asymétrique associée à ces lésions histologiques caractérise une cardiomyopathie hypertrophique (CMH), d'origine génétique.

L'affaire a été classée sans suite et une enquête familiale a pu être menée comportant des bilans cardiologiques puis des analyses génétiques chez les parents et son jeune frère. Le père était traité pour une cardiomyopathie dont le caractère génétique n'avait pas été déterminé, tandis que le frère avait un cœur morphologiquement normal. Les analyses génétiques ont révélé une mutation du gène codant pour la troponine T chez le cas index grâce aux prélèvements autopsiques congelés, et la même mutation chez le père et le frère. Le père et le frère ont pu bénéficier d'un traitement et d'un suivi.

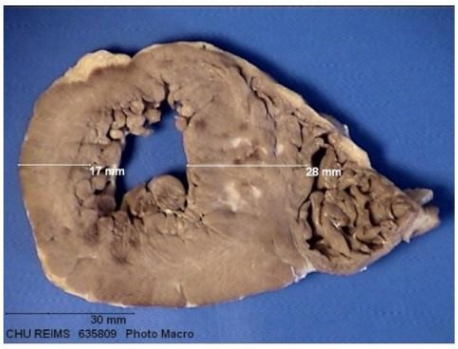


Figure 1. Tranche biventriculaire montrant l'importante hypertrophie ventriculaire gauche, asymétrique, à prédominance septale, caractéristique d'une CMH génétique.
Biventricular slice showing a severe left ventricular hypertrophy with septal predominance. A typical genetic hypertrophic cardiomyopathy pattern.

Cas 2

Un garçon de 15 ans est décédé subitement à son domicile, au repos. Il était suivi pour une CMH traitée par Propranolol. Le père présentait également une CMH due à une mutation du gène *MYBPC3* codant la protéine C cardiaque de la liaison de la myosine.

Une autopsie médicale a été demandée. Les pédiatres et cardiologues souhaitaient connaître la raison de la survenue de cette MSC en dépit du traitement et d'un suivi régulier.

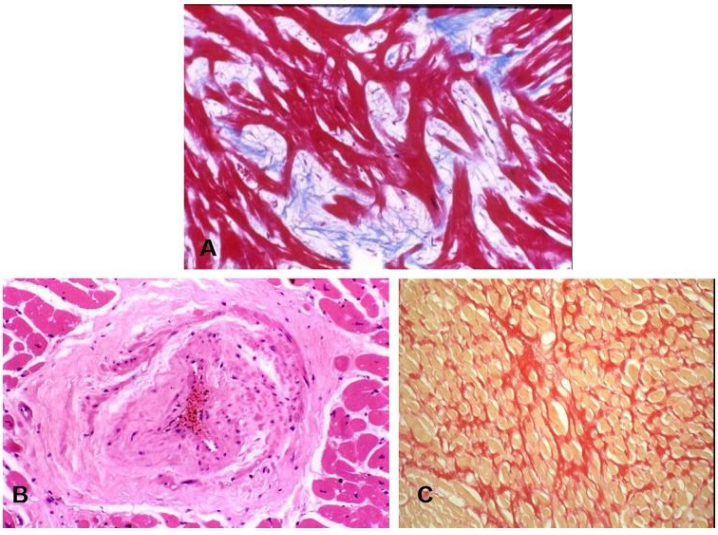


Figure 2. Histologie. A. Désorganisation architecturale des cardiomyocytes. Coloration : trichrome ; grossissement ×200. B. Dystrophie d'une artère intramyocardique. Coloration : HES ; grossissement ×200. C. Fibrose. Coloration : rouge Sirius ; grossissement ×200.
Histology. A. Myocyte disarray. Trichrome stain; magnification ×200. B. Intramyocardial artery dystrophy; HES stain; magnification ×200. C. Fibrosis. Sirius red stain; magnification ×200.

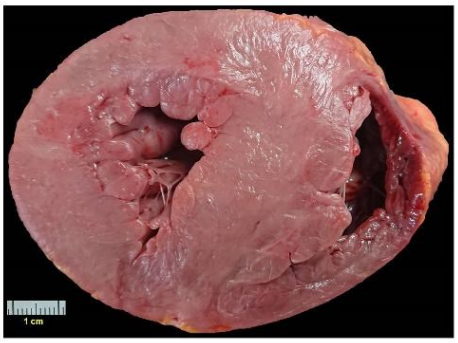


Figure 3. Tranche biventriculaire montrant l'importante hypertrophie ventriculaire gauche, asymétrique, à prédominance septale caractéristique d'une CMH génétique.
Biventricular slice showing severe left ventricular hypertrophy with septal predominance. Typical genetic hypertrophic cardiomyopathy pattern.

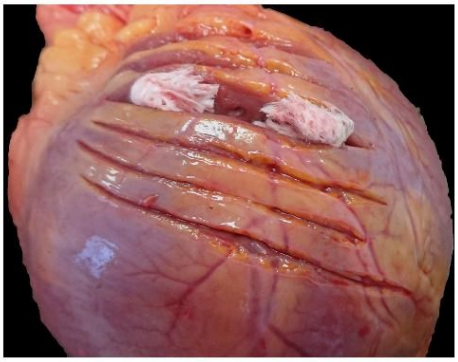


Figure 4. Pont myocardique de l'IVA.
Myocardial bridging.

L'autopsie a confirmé l'hypertrophie asymétrique (400 g ; épaisseur du septum : 25 mm ; épaisseur de la paroi libre : 20 mm) (Fig. 3) compte tenu des mensurations (1,67 m ; 42 kg). L'autopsie a en outre révélé la présence d'un pont myocardique au niveau du tiers moyen de l'IVA (Fig. 4).

L'examen histologique a montré les anomalies caractéristiques des CMH, désorganisation architecturale, fibrose importante et dystrophies des artères intramyocardiques.

Les analyses virologiques par biologie moléculaire ont révélé la présence de PVB19 (67 copies/µg dans le VG et 54 copies/µg dans le VD) et d'HHV6 (11 copies/µg dans le VG). Ces charges virales sont faibles.

Le pont myocardique a été considéré comme un facteur arythmogène surajouté à la CMH pour expliquer la mort subite [23]. La présence de deux virus, en dépit de faibles charges, peut être néanmoins considérée comme un facteur surajouté susceptible d'avoir contribué à la mort subite.

Cas 3

Un homme de 60 ans a été découvert décédé dans sa voiture légèrement accidentée. Une autopsie judiciaire a été ordonnée. Elle n'a pas révélé de lésion traumatique susceptible d'expliquer le décès, mais une importante cardiomégalie (poids du cœur : 620 g) en rapport avec une cardiomyopathie dilatée (CMD) (Fig. 5). Dans ce contexte, une origine génétique et/ou myocarditique a été recherchée à partir des prélèvements congelés autopsiques. Les analyses génétiques ont révélé une mutation du gène codant pour la desmine (p.Glu439Lys) et les analyses virologiques ont révélé la présence de trois virus, PVB19, HHV6 et Epstein Barr Virus (EBV). Cette surinfection virale explique probablement la survenue de la MSC en majorant le risque arythmogène de la CMD génétique.

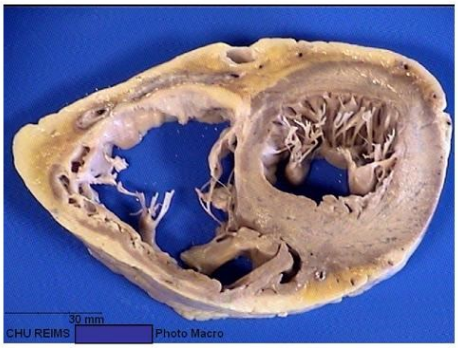


Figure 5. Tranche biventriculaire montrant la dilatatation biventriculaire. Cardiomyopathie dilatée.
Biventricular slice showing dilatation of both ventricles. Dilated cardiomyopathie.

Il est à noter que les seules analyses virologiques auraient amené à conclure à tort à une forme chronique de myocardite, dont l'expression morphologique est une CMD, identique à une CMD génétique.

Cas 4

Un nouveau-né de 24 jours, sans antécédent (39 SA + 1, APGAR 10/10) présentait au domicile parental « depuis quelques jours, des régurgitations et un inconfort au décours des biberons. » Un arrêt cardio-respiratoire est survenu subitement. Les soins intensifs de réanimation n'ont pas permis de reprise de l'activité cardio-respiratoire.

Une autopsie médicale a été pratiquée. Elle n'a pas révélé de cause de décès. L'analyse histologique du cœur complétée d'immunohistochimie a révélé une inflammation interstitielle CD3 et CD 68 positive modérée. Les analyses virologiques par RT-PCR ont révélé la présence d'un Entérovirus dans le cœur et les poumons. Les charges virales étaient très élevées (respectivement $3{,}77.10^4$ copies/µg d'acides nucléique ; $1{,}04.10^4$ copies/µg d'acides nucléique) indiquant une infection fulminante. L'étude phylogénique de la région codante (protéine virale 1 [VP1]) a permis de préciser la souche cardiotrope, echovirus E5.

Les autres PCR virales et bactériennes ont été négatives. Les hémocultures étaient stériles. Il n'existait pas de syndrome inflammatoire biologique (PCT, CRP), résultat typique des infections néonatales à entérovirus.

En conséquence, ce nouveau-né est décédé d'une forme fulminante cardio-pulmonaire d'infection néonatale à Entérovirus.

Annales de pathologie 41 (2021) 85—96

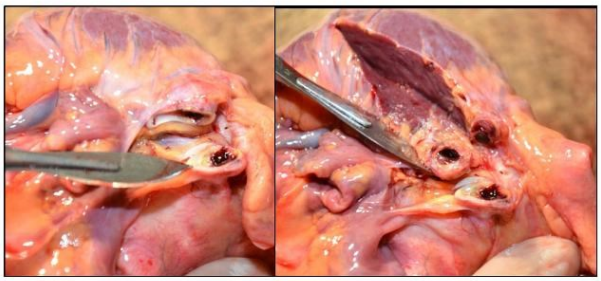


Figure 6. Anévrysme de l'artère coronaire droite compliqué de rupture de la chape athéroscléreuse et d'une thrombose.
Thrombosis complicating an anevrysm of the right coronary artery.

Cas 5

Un homme de 37 ans, sans antécédent, est décédé subitement sur la voie publique à la sortie d'un restaurant où il avait diné. Une autopsie judiciaire a été ordonnée.

Cet homme sans antécédent connu était considéré sportif (bodybuilding).

L'autopsie a révélé un poids du cœur sensiblement normal (430 g) compte tenu de ses mensurations (1,89 m ; 87 kg). L'examen macroscopique a révélé un anévrysme de l'artère coronaire droite, compliqué de thrombose (Fig. 6).

Les examens toxicologiques ont révélé une alcoolémie de 1,36 g/L, des concentrations sanguines de cocaïne de 332 μg/L et de son métabolite la benzoylecgonine de 384 μg/L. D'un point de vue toxicologique, ces concentrations suggéraient un décès par intoxication aiguë.

L'autopsie complétée des analyses toxicologiques a permis de préciser l'étiopathogénie : la MSC par arythmie a eu pour causes conjointes une intoxication aiguë par cocaïne (et alcool) et une thrombose coronarienne survenue sur un anévrysme, dans le contexte d'une athérosclérose accélérée, complication d'une intoxication chronique par cocaïne.

Ce cas illustre l'importance des analyses toxicologiques post-mortem, notamment chez le sujet jeune [24].

Cas 6

Un homme de 20 ans a été découvert décédé à son domicile. Il n'avait pas d'antécédent. Une autopsie judiciaire a été ordonnée. L'examen du cœur a révélé un infarctus transmural postéro-septal par thrombose de la coronaire droite (Fig. 7).

Les analyses biochimiques post-mortem ont montré une cholestérolémie de 9,37 mmol/L (35,2), associée à des concentrations de LDL de 8,18 mmol/L (< 4,1), de HDL de 0,82 mmol/L (> 1,03) et de Lp(a) de 0,41 g/L. Des analyses, 5 jours avant le décès montraient une cholestérolémie de 7,69 mmol/L associée à des concentrations de LDL de 6,46 mmol/L et de HDL de 0,7 mmol/L. En dépit de ces résultats, il n'avait pas de traitement. Ces dosages caractérisaient une dyslipoprotéinémie de type 2a, très athérogène, d'origine génétique.

D'un point de vue analytique, il est à noter la fiabilité des dosages post-mortem, dont les résultats sont proches de ceux ante-mortem.

Une enquête familiale a été menée chez les apparentés afin de dépister d'éventuels autres cas et ainsi les surveiller et les traiter précocement. Les analyses biochimiques post-mortem ont permis de déterminer l'origine génétique du syndrome coronarien athéroscléreux, circonstance susceptible d'être sous-estimée [25].

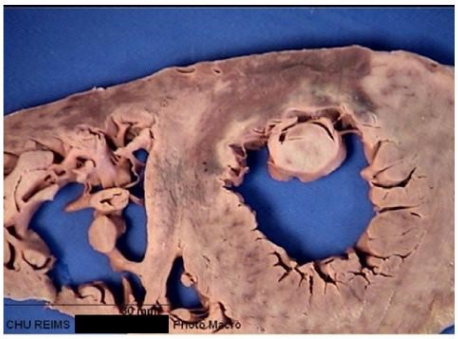


Figure 7. Tranche biventriculaire montrant l'infarctus du VG occupant les parois postérieure, septal et ventriculaire droite causée par une thrombose de l'artère coronaire droite.
Biventricular slice showing a myocardial infarction involving the posterior wall of the left ventricle, septum and right ventricle.

Conclusion

Les autopsies sont indispensables pour la connaissance et la prévention des MSC, notamment chez le sujet jeune. Dans cette catégorie d'âge, où les causes sont variées, une approche pluridisciplinaire est nécessaire. Le concept d'« autopsie moléculaire » souligne l'importance de la recherche d'une cause génétique. Toutefois, les analyses génotypiques doivent s'appuyer sur des diagnostics phénotypiques précis. L'examen macroscopique cardiaque n'est jamais suffisant. Les analyses histologiques sont indispensables, non seulement cardiaques, mais également pluriviscérales. D'autres investigations, notamment toxicologiques, virologiques, sont également indispensables pour établir la cause du décès, et orienter notamment vers une canalopathie génétique en cas de MSC *sine materia*.

Le médecin légiste a un rôle important, non seulement en tant qu'auxiliaire de la justice, pour contribuer à la manifestation de la vérité judiciaire, mais également en matière de santé publique. Nous avons indiqué que des dispositifs juridiques permettent de pratiquer des investigations complémentaires de l'autopsie en cas de classement sans suite d'une affaire.

Parmi les investigations complémentaires des autopsies, judiciaires ou médicales, les analyses histologiques sont primordiales, non seulement cardiaques mais également pluriviscérales. Les médecins légistes sont rarement également pathologistes. En matière judiciaire, des pathologistes non médecins légistes, sont donc désignés par l'autorité judiciaire aux fins d'expertises anatomo-pathologiques. À cet égard, la réforme du 3e cycle des études médicales a créé une « formation spécialisée transversale » (FST) d'« expertises médicales-préjudices corporels », permettant aux pathologistes non médecins légistes de pratiquer ces expertises. Dans le cadre des autopsies médicales, le pathologiste doit s'appuyer sur une collaboration étroite avec les autres spécialistes pour comprendre l'étiopathogénie des MSC et contribuer à leur prévention.

Remerciements

Les auteurs remercient le professeur Laurent Andreoletti, virologue, directeur du laboratoire de recherche EA-4684-CardioVir, université de Reims-Champagne-Ardenne, qui, avec son équipe, pratiquent les analyses virologiques et collaborent aux activités de recherche sur les myocardites virales.

Les auteurs remercient le docteur Caroline Rambaud, MCU-PH, pathologiste et médecine légiste à l'hôpital Raymond-Poincaré de Garches (AP—HP) pour sa précieuse collaboration dans le cas n° 4.

Les auteurs remercient Aurélien Guédra et Lucie Bernard, étudiants en médecine, en master de recherche, pour leur aide dans la préparation du manuscrit.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

[1] Mendis S, Puska P, Norrving B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control, WHO, editors: WHO; World Heart Federation; World Stroke Organisation; 2011.
[2] Chugh SS, et al. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. Prog Cardiovasc Dis 2008;51:213—28.
[3] Deo R, Albert CM. Epidemiology and genetics of sudden cardiac death. Circulation 2012;125:620—37.
[4] Priori SG, et al. Task force on sudden cardiac death of the European Society of Cardiology. Eur Heart J 2001;22:1374—450.
[5] Jouven X. Épidémiologie de la mort subite. Lettre Cardiol 2004;372:25—7.
[6] Basso C, Aguilera B, Banner J, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. Virchows Arch 2017;471:691—705.
[7] Kong MH, et al. Systematic review of the incidence of sudden cardiac death in the United-States. J Am Coll Cardiol 2011;57:794—801.
[8] Goldstein S. The necessity of a uniform definition of sudden coronary death: whitnessed death within 1 hour of the onset of acute symptoms. Am Heart J 1982;103:156—9.
[9] Myerburg RJ, Kessler KM, Castellanos A. Sudden cardiac death. Structure, function, and time-dependance of risk. Circulation 1992;85 [I2-10].
[10] Bagnall RD, Weintraub RG, Ingles J, et al. A prospective study of sudden cardiac death among children and young adults. N Engl J Med 2016;374:2441—52.
[11] Maron BJ, Doerer JJ, Haas TS, et al. Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the United States, 1980—2006. Circulation 2009;119:1085—92.
[12] Ackerman MJ, Tester DJ, Driscoll DJ. Molecular autopsy of sudden unexplained death in the young. Am J Forens Med Pathol 2001;22:105—11.
[13] Basso C, et al. Sudden cardiac death with normal heart: molecular autopsy. Cardiovasc Pathol 2010;19:321—5.
[14] SensarianC, Ingles J, Wilde AA. Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and approach to surviving relatives. Eur Heart J 2015;36:1290—6.
[15] Lecomte D, Hauw J. Les autopsies médico-scientifiques sont indispensables au progrès médical. Rapport du groupe de travail de la commission biologie. Académie Nationale de Médecine. Bull Acad Natle Med 2015;199:689—703 [séance du 7 avril 2015].
[16] Veress B, Alafuzoffl A. Retrospective analysis of clinical diagnoses and autopsy findings in 3042 cases during different time periods. Human Pathol 1994;25:140—5.
[17] Zarbo R, Baker P, Hpwanitz P. The autopsy as a performance measurement tool diagnosic discrepancies and unresolved clinical questions; A college of American PathologistsQ-Probes studies of 2479 autopsies from 248 institutions. Arch Pathol Lab Med 1999;123:191—8.
[18] Angelini P, Velasco JA, Flamm S. Coronary anomalies: incidence, pathophysiology and clinical relevance. Circulation 2002;105:2449—54.
[19] Kitzman DW, Scholz DG, Hagen PT, Ilstrup DM, Edwards WD. Age-related changes in normal human hearts during the first 10 décades of life. Part II (Maturity): a quantitative anatomic study of 765 specimens from subjects 20 to 99 years old. Mayo Clin Proc 1988;63:137—46.
[20] Stevens SM, Reiner K, Chugh SS. Increased left ventricular mass as a predictor of sudden ardiac death. Circulation 2013;6:212—7.
[21] Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. J Am Coll Cardiol 1998;32:1454—9.
[22] Nielsen TS, et al. The presence of enterovirus, adenovirus and ParvovirusB19 in myocardialtissue samples from autopsies: an evaluation of their frequencies in deceased individuals with myocarditis and in non-inflamed control hearts. Forensic Sci Med Pathol 2014;10:344—50.
[23] Ullal AJ, Abdelfattah RS, Ashley EA, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy as a cause of sudden cardiac death in the young: a meta-analysis. Am J Med 2016;129:486—96.
[24] Morentin B, Callado LF. Sudden cardiac death associated to substances of abuse and psychotropic T drugs consumed by young people: a population study based on forensic autopsies. Drug Alcohol Depend 2019;201:23—8.
[25] Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. Eur Heart J 2013;34:3478—90.

Annexe 6 : Myocarditis Presenting as Sudden Death in Infants and Children: A Single Centre Analysis by ESGFOR Study Group

Check for updates

Original Investigation

Pediatric and Developmental Pathology
2021, Vol. 24(4) 327–336
© 2021, Society for Pediatric Pathology
All rights reserved
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/10935266211007262
journals.sagepub.com/home/pdp
SAGE

Myocarditis Presenting as Sudden Death in Infants and Children: A Single Centre Analysis by ESGFOR Study Group

Oana Neagu[1], Amparo Fernández Rodríguez[2,3], Domitille Callon[3,4], Laurent Andréoletti[3,4], and Marta C Cohen[1,3,5]

Abstract

Background: Acute myocarditis is an inflammatory disease of the heart mostly diagnosed in young people, which can present as sudden death. The etiology includes infectious agents (mostly viruses), systemic diseases and toxins. We aim to characterize infants and children with myocarditis at post-mortem presenting as sudden deaths.

Methods: Retrospective evaluation of 813 post-mortems in infants and children dying suddenly and unexpectedly between 2009–2019. Data retrieved included histological features, microbiology and clinical history.

Results: 23 of 813 post-mortems reviewed corresponded to acute myocarditis and 1 to dilated cardiomyopathy related to remote Parvovirus infection. PCR identified enterovirus (7), parvovirus (7 cases, 2 also with HHV6 and 1 case with EVB), Influenza A (1), Parainfluenza type 3 (1). Two cases corresponded to hypersensitivity myocarditis, 1 was Group A Streptococcus and 5 idiopathic myocarditis. Enterovirus was frequent in infants (7/10), and in newborns was associated with meningoencephalitis or congenital myocarditis. More than 50% were less than 2 years of age and all remained clinically unsuspected.

Conclusion: Myocarditis represents almost 3% of all sudden pediatric deaths. Enterovirus and parvovirus were the most common viruses. This retrospective analysis showed that patients experienced viral symptoms but remained unsuspected, highlighting the need for more clinical awareness of myocarditis.

Keywords

encephalomyocarditis, eosinophilic myocarditis, myocarditis, post-mortem, post-viral cardiomyopathy

Introduction

Myocarditis is an inflammatory disease of the myocardium linked to a varying degree of cardiac impairment. Due to its variable clinical manifestation from insidious to severe fulminant forms, such as acute congestive heart failure, arrhythmias and sudden death (SD), its incidence is still unknown and probably underestimated.[1] In addition, assessing this diagnosis in clinical practice is laborious and requires advanced ancillary investigations, including invasive procedures.

Myocarditis is defined as an inflammatory process of the myocardium characterized by necrosis and/or degeneration of myocytes, in the absence of ischemic damage related to coronary artery disease (Dallas criteria).[2,3]

[1]Histopathology Department, Sheffield Children's NHS FT, Sheffield, UK
[2]Forensic Microbiology Laboratory, Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Madrid, Spain
[3]Joint Working Group of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group of Forensic and Postmortem Microbiology and the European Society of Pathology, Basel, Switzerland
[4]Clinical and Molecular Virology Unit, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France
[5]Department of Oncology and Metabolism, University of Sheffield, Sheffield, UK

Corresponding Author:
Marta C Cohen, Sheffield Children's Hospital NHS Foundation Trust, Western Bank, Sheffield S10 2TH, UK.
Email: Marta.Cohen@nhs.net

Current guidelines recommend a thorough investigation in order to exclude other cardiac conditions that can benefit from a specific treatment. Therefore, to render a diagnosis of myocarditis in clinical practice, it is essential to correlate medical history and current symptoms with results of electrocardiogram, echocardiography, cardiac MRI and laboratory tests (cardiac enzymes levels, inflammation markers, viral serology). Endomyocardial biopsy is an option available in dedicated centers and only in selected cases.[4] Moreover, a proportion of these patients experience a rapid and aggressive course of disease leading to death before the diagnosis is confirmed.

The evolution of myocarditis is unpredictable, and it can precipitate into a fatal arrhythmia or SD, regardless of the pathogenic phase or etiology. In the present study, we aimed to: i) identify and characterize all cases of acute or past myocarditis that resulted in sudden unexpected deaths in infants and children in our institution over more than a decade, ii) determine the incidence of myocarditis as a cause of SD, iii) characterize prodromal symptoms that had been present but not recognized.

Material and Methods

This study was conducted at the Sheffield Children's Hospital NHS Foundation Trust as a retrospective evaluation of pediatric post-mortem cases referred to Her Majesty Coroner as death had presented suddenly and unexpectedly. We interrogated our database during the period 2009–2019, which includes 813 cases. We excluded unnatural deaths, road traffic accidents, violent deaths, drowning, asphyxia/airway obstruction or suicides. Our pediatric center covers several counties of the North of England with ethnically and geographically diverse populations.

In the United Kingdom, investigation of all sudden unexpected deaths falls under the jurisdiction of HM Coroner. In pediatric cases, subspecialist pediatric pathologists undertake these post-mortem examinations, following the Kennedy protocol, jointly endorsed by the Royal College of Pathologists and the Royal College of Paediatrics and Child Health.[5] All cases with histologically confirmed acute myocarditis or in whom the cause of death was related to a previous myocarditis were included in the study. Data referring to the clinical history, prior symptoms, circumstances of death, and family history were gathered from the pediatrician, coroner, social service and general practitioner's reports. At the post mortem, blood samples were collected to investigate inborn errors of metabolism and to exclude the presence of toxic compounds (illicit drugs/alcohol or other drugs as indicated from the history) through toxicology analysis.[6] Skin samples were used for genetic analysis and fibroblast cultures to assess fatty acid oxidation defects.

The postmortem protocol also includes performing bacteriology and virology studies. The routine samples consist of nasal, tracheal and lung swabs, cerebrospinal fluid (CSF) and feces. Heart microbiological studies are included whenever myocarditis is suspected. The bacteriology test panel used in the cases included *Clostridium difficile*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. and routine cultures for bacteria and fungi from the blood, CSF and brain swab. The virology assay employs polymerase chain reaction (PCR) or Reverse-Transcriptase PCR to analyze the presence of several viruses: parvovirus B19 (PVB-19), Influenza A/B, Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenza I-IV-4, Human metapneumovirus, seasonal coronavirus, adenovirus, enterovirus (EV), Parechovirus and Herpes group viruses. No quantitative studies determining the number of copies were performed.

Comprehensive post-mortem internal examination and representative tissue sampling were carried out according to the current protocol.[5,6] The post-mortem myocardial samples were divided into two categories: one fixed in formalin (neutral buffered formaldehyde 30% diluted to 1/10) and embedded in paraffin for histopathology and one frozen and stored at −80°C for oil red O staining. This sample was also available for PCR analysis. The histology was always reported by a pediatric pathologist. A minimum of four heart tissue blocks (atrioventricular node, free walls of left and right ventricles and atriums, interventricular septum) were collected and examined in each case. In certain cases, the inflammatory infiltrate in the myocardium was better acknowledged using CD45, CD3, CD4, CD8, CD68 and CD20. The immunostaining C9 was used to confirm ischemia when this diagnosis was uncertain.[7] The final diagnosis of acute myocarditis was established following the Dallas criteria.[3] Clinical, pathological and ancillary tests findings were assembled and analyzed using a Microsoft Excel database.

Nucleic acids were extracted from fresh tissue when myocarditis was suspected at the time of post mortem (3/14). In most cases (11/14), the diagnosis was reached at the time of reporting the histology and nucleic acids were extracted from formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) cardiac tissue blocks. Briefly, samples were dewaxed and digested in proteinase K. Total nucleic acid (DNA and RNA) extractions were performed from tissue sample lysates using a NucliSens easyMAG device (BioMerieux). To detect human EV and all human herpesviruses, we employed PCR assays coupled to microarray hybridization analyses (Clart Entherpex V8.0). To detect human PV-B19 infections, we used a specific real-time PCR assay (Argene Biomerieux).[8]

One child presenting with SD showed a dilated cardiomyopathy which was thought to be related to a past PV-B19 infection. In this case it was necessary to use Real-time PCR. One of its advantages is the ability to identify amplified fragments during the early stages (exponential phase) of the process. This allows to measure the amount of product yielded, which is not possible in conventional PCR. The TaqMan technology, which implies the use of oligonucleotides and one fluorocrome-labeled probe is one of the most used chemistries in Real-time PCR. The Taq DNA polymerase used has the 5' to 3' exonuclease activity, which removes the probe by extending the DNA. The dissociation of the probe makes the reported molecules to emit fluorescent. The amount of fluorescence released during each run is directly proportional to the amount of DNA amplified.

This project was registered with Clinical Governance with the number SE1295.

Results

During the 11 years studied period, 24 post-mortem reports were related to recent or past myocarditis. Between 2009–2019, we performed a total of 813 pediatric post-mortems presenting as a sudden unexpected death. In 23/813 cases the etiology corresponded to acute myocarditis (2.8%). One case (0.12%) presented gross and histological features of dilated cardiomyopathy. Real-time PCR assay confirmed that the etiology was related to an undiagnosed remote PV-B19 infection. The number of histologically confirmed myocarditis increased over time owing to a parallel increase in the areas covered by Sheffield Children's Hospital and the number of post-mortems performed under the instruction of HM Coroner.

Most of the patients were below two years of age (13/24, 54%), with a mean age of 1.8 years (range 7 days-18 years old). In this series, the male: female gender ratio was 1.4:1 and less than half (45%) of the cases occurred in the late autumn or winter, reflecting no consistent association with colder months.

All viral myocarditis presented prodromal symptoms related to the primary infection site (see Table 1). In 87% of cases, symptoms had been present, and these had usually begun several days before death (average 3.5 days, median 3 days, range 1–10 days). Vomiting, breathing difficulties and lethargy were listed in the clinical presentation of patients with EV or PV-B19 myocarditis. Older patients (>6 years old) frequently had chest pain, abdominal pain, cough and increased heart rate. Clinical history in those cases with hypersensitivity myocarditis did not reveal any remarkable clinical information prior to the SD.

A virus was identified in 17/24 cases (70%). PCR and RT-PCR assays on the cardiac tissues identified 20 common human viruses in these 17 patients. PV-B19 and Enterovirus were the viruses most frequently detected, accounting for 62% of the study cases (8/24 and 7/24, respectively) (Table 1). Two children with PV-B19 had a co-infection with HHV6 and one with EBV. Influenza A and Parainfluenza type III were detected each in one case. *Streptococcus pyogenes* (Group A) infection was found to be accountable of one of the acute myocarditis. Hypersensitivity myocarditis was the final diagnosis in two children. The etiology remained unknown in 16% of cases (4/24) after performing (RT)-PCR techniques and excluding metabolic and drug-related causes.

Human PV-B19 affected older children compared to EV, with an average age of 6.6 years old and a median of 8.5 years old (range 1–13). Females were more frequently infected (male: female ratio = 1:3) in our cohort. PCR assays identified PV-B19 DNA in 8/24 of the cardiac samples. Seven cases depicted diffuse active myocarditis. In one case, the post mortem examination showed features of dilated cardiomyopathy with heart failure. The histology in this case showed only focal and minimal lymphoid inflammation, which prompted the search for a viral etiology (see below). In two cases younger than 2 years old, there was a co-infection with HHV6. In one case of an 8 years old child, the clinical presentation emerged as an acute abdominal pathology with persistent vomiting. The patient underwent an exploratory laparotomy, which was negative, and he was unresponsive to maximal care treatment. The histology and virology assays confirmed a PV-B19 and EBV co-infection of the myocardium.

Seven cases showed florid, diffuse myocarditis with prominent lymphocytic infiltrate and necrotic foci affecting both ventricles. Associated lymphocytic inflammation of the lungs was identified in only two cases (although no virus was detected). PCR assay on different samples was for the most part positive in heart tissues, except for one case with PV-B19 viral genome also detected in the respiratory tract.

The case diagnosed as dilated cardiomyopathy disclosed minimal lymphoid inflammation with no necrosis. However, virologic analyses from the heart tissue identified human PV- B19 with a mean viral load of 1675 copies/μg of extracted DNA. Viral loads of PV-B19 higher than 500 copies/μg of extracted DNA have been shown to be related with ongoing myocardial inflammation, either at acute phase or during reactivation of chronic PV-B19 infection.[9] Consistently, according to the past medical history, the 10 years old girl had a few weeks history of leg pain and more recently had weakness, abdominal pain and vomits. She attended the emergency department and the symptoms were interpreted as corresponding to a urinary infection. She was discharged home but was found unresponsive the

Table 1. Clinical Features Presenting in 20/24 Cases When the Etiology of Myocarditis Was Identified.

Etiology	No. of Cases	Onset of Symptoms Before SD		Diarrhea	Vomiting	Breathing Difficulties	Lethargy	Respiratory Symptoms	Other Symptoms
		Mean (Days)	Median (Days)						
Enterovirus	7	2.5	3 Range (1–5)	+	++	+	++++	–	tachycardia (180–190 bpm), poor feeding
PVB19 alone	5	2.8	3 Range (1–9)	–	++++	++	+	–	Chest and abdominal pain
PVB19 + HHV6	2	2.5	Range (1–4)	–	–	++	–	–	Poor feeding
PVB19 + EBV	1		5	–	+	–	–	–	Nausea Abdominal pain
Influenza A	1		4	–	+	–	+ (last days)	Recent cold, persisting cough (4 weeks)	Loose stools (last days)
Parainfluenza type III	1	–	–	–	–	–	–	–	–
Streptococcus pyogenes (GAS)	1	2	2	–	+	–	–	Sore nose	Nausea
Hypersensitivity	2		3	–	–	+	–	–	–

following morning. Histology examination showed prominent fibroelastosis, patchy fibrosis and frequent hypertrophy of cardiomyocytes. The lungs had evidence of congestive heart failure with presence of intra-alveolar hemosiderin-laden-macrophages in the lungs and centrilobular necrosis with congestion in the liver (Figure 1).

EV RNA genome was detected by RT-PCR from cardiac tissue in seven cases of acute myocarditis. In three cases, the identified viral strain was Coxsackie group B, while the others could not be identified at species level. All patients with EV myocarditis were males and 6/7 cases presented as SD in the neonatal period (median age 8 days, range 7–9). Two of them had been born prematurely (36 and 37 weeks of gestational age). Five of these infants associated histologic features of meningoencephalitis. Virology investigations confirmed the presence of EV in CSF samples, two of which were identified as Coxsackie group B. The swabs from the superior respiratory tract were invariable positive for EV and the stool sample was positive for this virus in 5/7 cases. Histologically, the myocardium showed patchy inflammatory infiltrates in three cases and diffuse interstitial inflammation in the remainder. Lymphocytes were the main constituent except for one case which had an associated neutrophilic response as well. Myocardial degeneration was assessed with the aid of C9 immunostaining in all cases. One case presented as a congenital diffuse myocarditis with areas of dystrophic calcification in a 9 days old infant, demonstrating the likely intra-uterine myocardial injury (Figure 2). Immunohistochemistry was used in only 6 cases. CD45 was used in 4 cases; T cell markers (CD3, CD4 and CD8) and B cell markers (CD20 and CD79) were used in 3 cases, and CD68 in 1 case. The results confirmed the lymphoid infiltrate in all cases, and the T cell linage in the 3/6 cases in which this was explored.

Influenza A was isolated in a single case of a 2 years old girl with recent cold and persistent cough over the previous 4 weeks, which worsened with lethargy and loose stools in her last days. The virology assay identified viral RNA in the nasal, tracheal swabs and heart tissue. The histology examination confirmed an ongoing viral infection of the respiratory tract. The myocardium showed florid myocarditis, mainly on the left ventricle, with hemorrhage and myocardial necrosis, associated with focal lymphoid infiltrates (Figure 3).

Parainfluenza type III was responsible for a single case of active myocarditis associated with dilated cardiomyopathy diagnosed in a 5 months female infant. There were no relevant symptoms in the previous days before her SD, although the clinical history revealed a viral episode one month prior. The virology study identified Parainfluenza type III in the nose and heart tissues. At internal examination, the heart was globally enlarged

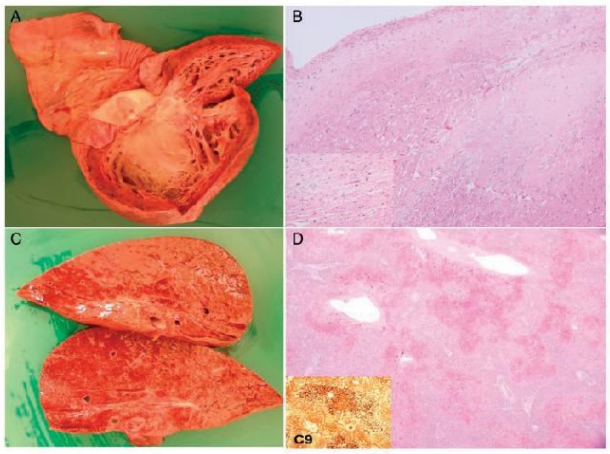


Figure 1. Dilated cardiomyopathy related to latent Parvovirus infection. A, Dilated left ventricle with prominent trabeculae. B, Myocardium with subendocardial fibrosis (H&E 10×); inset: cardiomyocytes with hypertrophic features (H&E 40×). C, Liver with heterogeneous cut-section. D, Liver congestion with centrilobular necrosis (H&E 4×); inset: C9 positive in necrotic hepatocytes (20×).

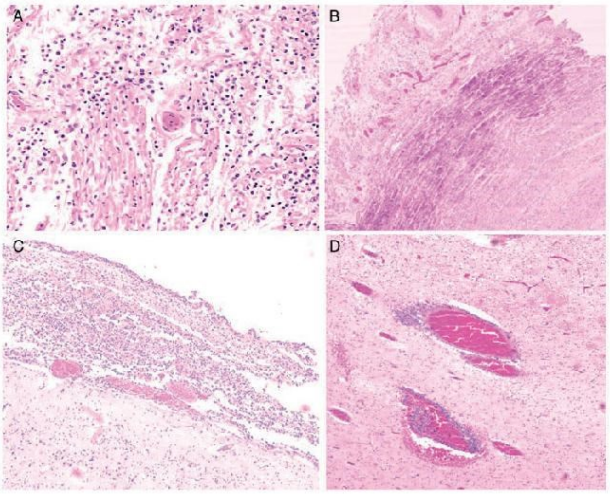


Figure 2. Enterovirus encephalomyocarditis of likely intrauterine origin. A, Acute myocarditis with lymphocytic inflammatory infiltrate (H&E 20×). B, Dystrophic calcification of the myocardium (H&E 4×). C, lymphocytic inflammatory infiltrate in the meninges and in the subarachnoid space (H& E 10×). D, viral encephalitis with perivascular lymphocytic inflammation (H&E 10×).

showing old and recent thrombi attached to the endocardium. Microscopy examination revealed a mild and patchy mononuclear inflammatory cell infiltrate with plasma cells associated with myocyte necrosis, mainly perivascular or subendocardial. The endocardium of the left ventricle showed fibroelastosis and there were myocytes with enlarged nuclei consistent with hypertrophy in all areas of the heart.

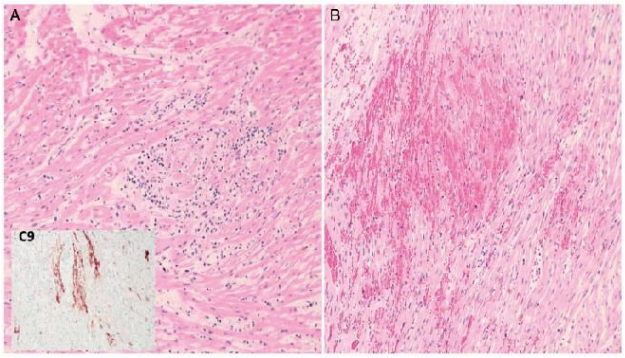


Figure 3. Influenza A myocarditis. A, Focal lymphoid infiltrates associated with cardiomyocyte degeneration (H&E 10×), inset: necrotic areas positive for C9 (20×). B, Focal haemorrhage and myocardial necrosis (H&E 20×).

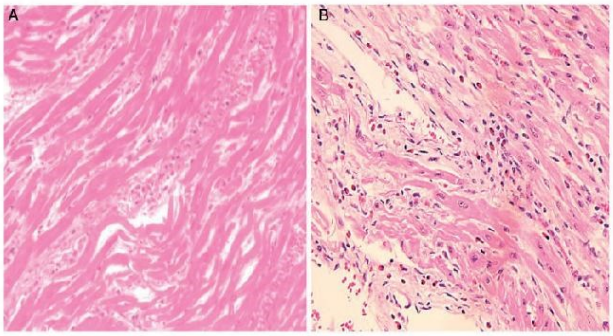


Figure 4. Hypersensitivity myocarditis. A, Patchy areas of myocardial necrosis, oedema and inflammatory cell infiltrate represented by eosinophils (H&E20×). B, High power view of eosinophilic inflammation associated with cardiomyocyte degeneration (H&E 40×).

Acute myocarditis related to *Streptococcus pyogenes* (group A Streptococcus, GAS) was the final diagnosis established in a 6 years old girl who died within a day after the onset of a sore throat, nausea and frequent vomiting. Microbiological cultures yielded *S pyogenes* from blood and nasopharynx, lung and bronchial swabs. Though the heart showed diffuse severe myocarditis, which also involved the pericardium and the atrioventricular node, no microorganisms were isolated.

Hypersensitivity myocarditis was the final diagnosis in two cases. One case was detected in a SD of an 18 years old boy with no previous medical history. The histological findings were characterized by florid eosinophilic infiltrates in the heart samples, more prominent in the left ventricle and the septum. No other organ showed any feature of hypereosinophilia. The second case presented in an 8 months old infant born at term + 12 days weighing 4170 g. He was admitted to the hospital two days before his collapse for breathing difficulties and was diagnosed with bronchiolitis. Despite positive virologic detection of the upper respiratory tract swabs for Parechovirus, there were no signs of significant bronchial, interstitial or tracheal inflammation on histology. On the contrary, myocardium sections show patchy areas of myocardial necrosis, edema and prominent eosinophilic infiltrates (Figure 4). There was also an increase of eosinophils in the bone marrow and focally in the lungs, which raised the suspicion of Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome. Toxicology, microbiology and myocardial virology assays were negative in both cases.

Despite extensive bacteriologic and virologic analyses, the etiology remained unknown in four cases (4/24), which displayed diffuse lymphocytic myocarditis on histology (Table 2). All these cases were males, with a median age of 4 years old (range 0.25–6). The clinical presentation was similar to those cases in whom a virus was identified as the etiology of the myocarditis. Adenovirus and parainfluenza 1 virus were isolated in one case (1/4) from the nasal swab and Enterovirus was identified in the nasal and tracheal swabs in another case (1/4). Histologically, three cases showed a diffuse pattern of lymphoid inflammation with necrosis, scattered eosinophils and macrophages and the remainder showed focal lymphocytic infiltrate, more prominent in the left ventricle.

Discussion

Previous studies conducted on post-mortem data identified myocarditis in 8.6% to 12% of cases of SD in young adults.[10] Amongst children, myocarditis has been reported in 1.8% to 16% of sudden unexpected deaths,[10,11] whilst the incidence rate varies between 0.26–1.95/100000 person-year.[12] This may suggest that the prevalence of active myocarditis contributes to a significant number of sudden and unexpected deaths in infants and children. In the present report histological, immunostaining and microbiological examination of cardiac tissues were used to thoroughly investigate various causes of pediatric myocarditis.[13,14] Our study demonstrated a prevalence of 2.8% pediatric SDs induced by myocarditis over the last ten years, reflecting an incidence of lethal myocarditis between 0.1–0.8/100000 children per year in our region. The incidence of myocarditis in children is uncertain but it is estimated that 1 per 100,000 children per year are affected. It has been reported that 0.05% of all paediatric hospitalizations are for myocarditis.[15]

In the present retrospective report, the major etiology in our acute myocarditis series was Human PV-B19. According to recent literature, there is a shift in viral induced myocarditis, with increasing numbers of PV-B19 cases, against the common Coxsackie B virus.[16] However, EV and PV-B19 myocarditis shows an equally rapid course.

As previously noted,[17] our cohort showed that PV-B19 myocarditis affected more often females, and patients were usually older when compared to those cases related to EV. SD occurred rapidly after the onset of symptoms, with a median duration of three days, which is in keeping with a fulminant myocarditis. In the present report, PV-B19 myocarditis showed a diffuse and prominent inflammation associated with myocardial necrosis in 7/8 cases. Although patients experienced respiratory or digestive symptoms, for the most part the PCR test was positive only in the heart tissue. In a previous large patient investigation, Kuhl et al.[18] describes that 27.3% of patients have multiple-agent infections of the myocardium. The most common co-infections correspond to PV-B19 and HHV6 (15.8%). Dual infection of PV-B19 with HHV6 usually results in a more severe clinical course and predicts chronic ventricular dysfunction due to persistent latent virus infections with reactivations episodes.[18]

In patients with chronic dilated cardiomyopathy (CDM), PV-B19 genome is found in 35–51%, suggesting that it develops from a previous infectious myocarditis.[7,9] As described in one of our cases with dilated cardiomyopathy, the histologic features of long-term myocardial damage consisting of interstitial fibrosis, scattered lymphocytes, cardiomyocyte hypertrophy and syncytial disarray, and the significant cardiac PV-B19 viral load ((>500 copies/μg of extracted nucleic acids)

Table 2. Clinical Features Identified in Patients With Idiopathic Myocarditis (4/24).

				Prodromal Symptoms	
Case	Age	Associated Conditions	Ancillary Investigations	Mean (Days) 6.25	Median (Days) 6.5 (Range: 2–10)
1	5y	None	Negative	Abdominal pain vomiting	
2	6y	Prematurity (25 w) Cerebral palsy Bilateral lobar pneumonia	Negative	Breathing difficulties Fever Cough	
3	3y	Acute tracheo-Bronchitis	Adenovirus and Parainfluenza 1 in the nose swab	Breathing difficulties Fever Cough	
4	3m	Prematurity (36 w)	Enterovirus in the nose and tracheal swabs	Diarrhea Vomiting	

y: year; m: months.

support myocarditis as the cause of the child's cardiomyopathy.[9,19,20]

Although this entity is diagnosed mainly in adults, children are also prone to persistent dysfunction requiring medical therapy and transplantation.[21] As a limitation of this study, it should be mentioned that the viral loads were detected only in the case where the FFPE myocardium was analyzed, but not routinely in fresh cardiac tissue. However, the presence of viruses in the heart tissue altogether with the evidence of histological findings showing the myocardium damage could account for the viruses to be responsible of it. Another limitation of the study is the lack of controls, as PCR investigations were not conducted in those cases that did not show histological evidence of myocarditis. Therefore, there was no control group.

Although pediatric myocarditis has a broad spectrum of etiologies, most cases within the studied pediatric population in United Kingdom occur due to a viral infection. Among viruses related to acute myocarditis, EVs represent a major causative pathogen in infants, especially males. New-born and premature babies are particularly vulnerable to EV infections because of the immaturity of the immune system.[22] However, the transmission may be through the placenta, given the incubation period for EV is up to 10 days. In our series, the median age of EV infection was 8 days, in keeping with literature data.[23] In 5/7 of our cases, the patients were younger than 9 days of age, reinforcing the possibility of vertically transmitted infection from mother to baby. One case showed dystrophic calcification in the heart, thus in keeping with the prenatal onset of disease. The prodromal symptoms were non-specific, mostly in keeping with the cardiac failure, and emerged to collapse in less than three days. Dettmeyer et al.[24] suggest that in cases with a fulminant course of the myocarditis, the physiopathological mechanism relates to a malignant arrhythmia secondary to the involvement of the conduction system. A recent British pediatric surveillance study,[25] showed that the combined incidence of human EV and parechovirus meningitis was 0.83/1000 live births (more than double that for bacterial meningitis), with an incidence of severe complication or death of less than 1%. However, in the present series, 71% of the EV myocarditis was associated with meningoencephalitis, which emphasizes the aggressive potential of this viral infection. The virology analysis was positive in all cases in the CSF and nasal swab, suggesting the value of these investigations in symptomatic infants.

Respiratory viruses have been reported as potential causes of severe or fatal myocarditis.[26] Seasonal Influenza A is unusual to cause fatal myocarditis and the prevalence ranges from 0 to 11%, with a variable clinical appearance.[27] Another study reported only two myocarditis cases in 505 children (0.4%) admitted with laboratory-confirmed influenza during the 2003/2004 season in Canada, one of which was lethal.[28] Clinical manifestations are mainly respiratory, as seen herein. Influenza-related mortality rate is reduced and is typically reported amongst debilitated children. Histologically, the lymphocytic infiltrate is present both in the respiratory tract and in the cardiac muscle, suggesting that myocarditis is an acute complication of the primary infection. Encephalopathy and meningitis may also occur in occasional cases presenting as an altered state of consciousness with or without convulsions. Parainfluenza 3 virus usually causes respiratory viral infections among hospitalized newborns, which are not clinically suspected because the signs and symptoms are nonspecific or too subtle. Several case reports on myocarditis describe a moderate, mixed inflammatory infiltrate in this type of viral disease, as seen in our cases.[29,30]

In the GAS associated case, myocardial injury was interpreted as a cross-reaction between antibodies produced by GAS and cardiac myosin, given the negative results of other ancillary investigations.

Hypersensitivity myocarditis resides in the category of eosinophilic myocarditis. It stands for drug related cardiac injury and comprises numerous trigger medications (clozapine, sulfonamide, penicillin antibiotics, methyldopa, anti-seizure drugs among others).[31] Its incidence is unknown due to its rarity. A larger study on 288 heart transplants reported histological evidence of hypersensitivity myocarditis in 2.4% of the cases.[32] Myocardial eosinophilia may arise in the setting of Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome (IHS), which is currently defined as absolute eosinophilic count $\geq$1500/μL and clinical manifestations attributable to eosinophilia or tissue hypereosinophilia with blood eosinophilia.[33] Presence of eosinophilic infiltrates in the myocardium ("eosinophilic myocarditis") has also been described with viral infection (human herpesvirus-6, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus), parasitic infections, asthmatic bronchitis, mycoplasma pneumonia, specific clonal myeloid abnormalities and autoimmune conditions among others.[34,35] In our cases, neither toxicology, microbiological analysis nor medical history detected a causative drug and the eosinophilic count from the peripheral blood was not available to confirm a diagnosis of IHS.

Conclusion

This retrospective study identified myocarditis to represent almost 3% of all SDs in infants and children over the last eleven years in UK pediatric population. Postmortem examination is a reliable method to identify patterns and etiologies of active myocarditis. Using a comprehensive approach including detailed histology,

molecular biology-based techniques, microbiology, toxicology and metabolic assays cause of sudden deaths in infancy and childhood can be accurately identified. Herein, viral genomes were isolated from the cardiac tissue in 70% of histologically confirmed myocarditis, as described in previous studies.[36] Although PV-B19 and EV were the most common viruses (62%), herpesviruses (HHV6, or EBV) and respiratory viruses (Influenza A and Parainfluenza type III) should be equally included in the panel. Although retrospective analyses showed that patients experienced vomiting, abdominal pain, lethargy and/or breathing difficulties, all remained clinically undiagnosed, highlighting the need for more clinical awareness of this condition. Apart of these prodromal symptoms, this study shows that a worsening of a previous cold or other viral respiratory infection could be the only clinical clue suggesting a myocarditis caused by respiratory viruses.

Authors' Note

This study was presented in part at the 32th ESP Congress & XXXIII IAP Congress, December 2020.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

ORCID iD

Marta C Cohen https://orcid.org/0000-0001-5534-444X

References

1. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, et al. Update on myocarditis. *JAC*. 2012;59(9):779–792.
2. Cooper LT, Sagar S, Liu PP. Myocarditis. *Lancet*. 2012;379(9817):738–747.
3. Thomas Aretz H. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol*. 1987;18(6):619–624.
4. Leone O, Veinot JP, Angelini A, et al. 2011 Consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. *Cardiovasc Pathol*. 2012;21(4):245–274.
5. Royal College of Pathologists. Sudden unexpected death in infancy and childhood Multi-agency guidelines for care and investigation. https://www.rcpath.org/uploads/assets/874ae50e-c754-4933-995a804e0ef728a4/Sudden-unexpected-death-in-infancy-and-childhood-2e.pdf. Published 2016. Accessed January 2, 2021.
6. Confidential Enquiry into Maternal and Child Health, Scottish Cot Death Trust. Guidelines on autopsy practice scenario 8: sudden unexpected deaths in infancy (SUDI). https://www.rcpath.org/uploads/assets/b580c19a-ab50-4bc9-abc08a8153e7326c/8-SUDI-Jan05-AR.pdf. Published January 2005. Accessed January 2, 2021.
7. Jasra SK, Badian C, Macri I, Ra P. Recognition of early myocardial infarction by immunohistochemical staining with cardiac troponin-I and complement C9. *J Forensic Sci*. 2012;57(6):1595–600.
8. Nguyen Y, Renois F, Leveque N, et al. Virus detection and semiquantitation in explanted heart tissues of idiopathic dilated cardiomyopathy adult patients by use of PCR coupled with mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):2288–2294.
9. Bock CT, Klingel K, Kandolf R. Human parvovirus B19–associated myocarditis. *N Engl J Med*. 2010;362(13):1248–1249.
10. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation*. 2006;113(6):876–890.
11. Weber MA, Ashworth MT, Risdon RA, et al, Clinicopathological features of paediatric deaths due to myocarditis: an autopsy series. *Arch Dis Child*. 2008;93(7):594–598.
12. Levine MC, Klugman D, Teach SJ. Update on myocarditis in children. *Curr Opin Pediatr*. 2010;22(3):278–283.
13. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J*. 2008;29(17):2073–2082
14. Caforio ALP, Pankuweit S, Arbustini E, 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*. 2013;34(33):2636–2648.
15. Myocarditis Foundation. Myocarditis in children: incidence, clinical characteristics and outcomes. https://www.myocarditisfoundation.org/myocarditis-in-children-incidence-clinical-characteristics-and-outcomes/. Published July 29, 2020. Accessed November 15, 2020.
16. Canter CE, Simpson KP. Diagnosis and treatment of myocarditis in children in the current era. *Circulation*. 2014;129(1):115–128.
17. Vigneswaran TV, Brown JR, Breuer J, Burch M. Parvovirus B19 myocarditis in children: an observational study. *Arch Dis Child*. 2016;101(2):177–180.
18. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2005;111(7):887–893.
19. Davies MJ, McKenna WJ. Introduction to pathology and pathogenesis. *Heart*. 1994;72:S2–S3.
20. Verdonschot J, Hazebroek M, Merken J, et al. Relevance of cardiac parvovirus B19 in myocarditis and dilated cardiomyopathy: review of the literature. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(12):1430–1441.
21. Molina KM, Garcia X, Denfield SW, et al. Parvovirus B19 myocarditis causes significant morbidity and mortality in children. *Pediatr Cardiol*. 2013;34(2):390–397.
22. Khediri Z, Vauloup-Fellous C, Benachi A, Ayoubi JM, Mandelbrot L, Picone O. Adverse effects of maternal enterovirus infection on the pregnancy outcome: a prospective and retrospective pilot study. *Virol J*. 2018;15(1):70.

23. Inwald D, Franklin O, Cubitt D, Peters M, Goldman A, Burch M. Enterovirus myocarditis as a cause of neonatal collapse. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;89(5):461–463.
24. Dettmeyer R, Baasner A, Schlamann M, Haag C, Madea B. Teaching case coxsackie B3 myocarditis in 4 cases of suspected sudden infant death syndrome: diagnosis by immunohistochemical and molecular-pathologic investigations. *Pathol Res Pract.* 2002;198:689–696.
25. Kadambari S, Braccio S, Ribeiro S, et al. Enterovirus and parechovirus meningitis in infants younger than 90 days old in the UK and Republic of Ireland: a British Paediatric Surveillance Unit study. *Arch Dis Child.* 2019;104(6):552–557.
26. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, 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.* 2003;42(3): 466–472.
27. Aykac K, Ozsurekci Y, Kahyaoglu P, et al. Myocarditis associated with influenza infection in five children. *J Infect Public Health.* 2018;11(5):698–701.
28. Moore DL, Vaudry W, Scheifele DW, et al. Surveillance for influenza admissions among children hospitalized in Canadian immunization monitoring program active centers, 2003-2004. *Pediatrics.* 2006;118(3):e610–e619.
29. Romero-Gómez MP, Guereta L, Pareja-Grande J, et al. Myocarditis caused by human parainfluenza virus in an immunocompetent child initially associated with 2009 influenza A (H1N1) virus. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):2072–2073.
30. Aranda Cazón C, Arruza Gómez L, Herranz Carrillo G, et al. Parainfluenza 3 respiratory infection associated with pericardial effusion in a very low birthweight infant. *Case Rep Infect Dis.* 2017;2017:1–4.
31. Park Y, Ahn SG, Ko A, et al. Hypersensitivity myocarditis confirmed by cardiac magnetic resonance imaging and endomyocardial biopsy. *Korean J Intern Med.* 2014; 29(2):236–240.
32. Lewin D, d'Amati G, Lewis W. Hypersensitivity myocarditis: findings in native and transplanted hearts. *Cardiovasc Pathol.* 1992;1:225–229.
33. Klion A. Hypereosinophilic syndrome: approach to treatment in the era of precision medicine. *Hematology.* 2018;2018(1):326–331.
34. Sheikh H, Siddiqui M, Uddin SMM, Haq A, Yaqoob U. The clinicopathological profile of eosinophilic myocarditis. *Cureus.* 2018;10(12):e3677.
35. Cheung CC, Constantine M, Ahmadi A, Shiau C, Chen LYC. Eosinophilic myocarditis. *Am J Med Sci.* 2017; 354(5):486–492.
36. Andréoletti L, Lévêque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P. Viral causes of human myocarditis. *Arch Cardiovasc Dis.* 2009;102(6–7):559–568.

Annexe 7 : Coinfection of Parvovirus B19 with Influenza A/H1N1 Causes Fulminant Myocarditis and Pneumonia. An Autopsy Case Report.

pathogens

MDPI

Case Report

Coinfection of Parvovirus B19 with Influenza A/H1N1 Causes Fulminant Myocarditis and Pneumonia. An Autopsy Case Report

Domitille Callon [1,2,*], Fatma Berri [1], Anne-Laure Lebreil [1], Paul Fornès [1,2] and Laurent Andreoletti [1,3]

[1] Cardiovir EA-4684, Faculty of Medicine, University of Reims Champagne Ardenne, 51097 Reims, France; fatma.berri@gmail.com (F.B.); anne-laure.lebreil@univ-reims.fr (A.-L.L.); pfornes@chu-reims.fr (P.F.); landreoletti@chu-reims.fr (L.A.)
[2] Pathology Department, Academic Hospital of Reims, Robert Debré, 51097 Reims, France
[3] Virology Department, Academic Hospital of Reims, Robert Debré, 51097 Reims, France
* Correspondence: dcallon@chu-reims.fr; Tel.: +33-326918115

Abstract: Parvovirus-B19 (PVB19) is a frequent causative agent of myocarditis. For unclear reasons, viral reactivation can cause acute myocarditis, a leading cause of sudden death in the young. Influenza A/H1N1(2009) virus (IAV/H1N1) is known for causing flu/pneumonia, but the heart is rarely involved. Co-infections of cardiotropic viruses are rarely reported and the mechanisms of viral interactions remain unknown. A 5-year old girl had a flu-like syndrome, when she suddenly presented with a respiratory distress and cardiac arrest. At autopsy, the lungs were found haemorrhagic. Lungs' histology showed severe bronchiolitis, diffuse haemorrhagic necrosis, and mononuclear inflammation. In the heart, a moderate inflammation was found with no necrosis. IAV/H1N1 was detected in nasal and tracheal swabs, lungs, and the heart. The viral load was high in the lungs, but low in the heart. PVB19 was detected in the heart with a high viral load. Viral co-infection increases the risk of severe outcome but the mechanisms of interaction between viruses are poorly understood. In our case, viral loads suggested a reactivated PVB19-induced acute myocarditis during an IAV/H1N1 pneumonia. Viral interactions may involve an IAV/H1N1-induced cytokine storm, with a fulminant fatal outcome. Clinically, our case shows the importance of investigating inflammatory pathways as therapeutic targets.

Keywords: influenza A/H1N1; pneumonia; myocarditis; Parvovirus B19; case report

check for updates

Citation: Callon, D.; Berri, F.; Lebreil, A.-L.; Fornès, P.; Andreoletti, L. Coinfection of Parvovirus B19 with Influenza A/H1N1 Causes Fulminant Myocarditis and Pneumonia. An Autopsy Case Report. *Pathogens* **2021**, *10*, 958. https://doi.org/10.3390/pathogens10080958

Academic Editor: Anna Honko

Received: 5 July 2021
Accepted: 28 July 2021
Published: 29 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Human Parvovirus B19 (PVB19) is one of the most frequent causative agents of myocarditis, together with Enteroviruses and Herpes virus type 6 (HHV6) [1]. PVB19 is sometimes found in the heart as a bystander virus with no pathological effects [2]. The genome of PVB19 consists of a single-stranded DNA molecule of approximately 5.5 kb. Infection with PVB19 is common, with approximately 70–90% of adolescents having anti-PVB19 IgG detectable in serum. PVB19-infection is usually benign and in children it most commonly manifests with erythema infectiosum (fifth disease) [3]. Moreover, after an asymptomatic phase, for unclear reasons, reactivation of the virus can cause acute myocarditis, one of the leading causes of sudden death in the young [3–5]. Influenza A/H1N1 (2009) virus is known for causing flu and pneumonia, but the heart is very rarely involved [6,7]. Between 11 June 2009, and 10 August 2010, an influenza pandemic was declared by the World Health Organization. Worldwide, more than 13,500 patients died of influenza A/H1N1 (2009) infection. The death prevalence was similar in seasonal influenza as well as influenza A/H1N1 (2009) infections (0.3%), but the decedents' characteristics were different. Influenza A/H1N1 (2009) involved mostly young apparently healthy patients [8]. Most of the deaths occurred in patients hospitalized with respiratory symptoms, fever, and

digestive symptoms, including diarrhea and vomiting [9]. Detrimental inflammation of the lungs is a hallmark of severe influenza A virus infections [9]. Coinfections involving common cardiotropic and other viruses have rarely been reported. Viral co-infection increases the risk of severe outcome but the mechanisms of interaction between viruses are poorly understood [10]. Histology, immunohistochemistry, and virological molecular analysis are the gold standard in both endomyocardial biopsies and autopsy samples [10]. Frequent inadequate diagnostic tools explain underdiagnosis of myocarditis, especially in the young. When an autopsy is performed, lungs and heart tissues are rarely frozen, despite European guidelines [11]. We report on an autopsy case involving a 5-year old girl, who died of a co-infection involving a PVB19 myocarditis and an Influenza A/H1N1 pneumonia.

2. Case Presentation

A 5-year old girl was treated at home for a flu-like syndrome for 2 days with anti-inflammatory medications. Due to worsening breathing difficulties, her parents took her to the paediatric emergency room. The paediatricians noted pallor, asthenia, and thoraco-abdominal asyncrhony with chest indrawing. Pulmonary auscultation was abnormal. Neutrophils count was elevated with 6.56 G/L. She suddenly presented with a respiratory distress leading to a cardiac arrest. She had no diagnosis or medical history indicating diminished immunocompetence.

At autopsy, the lungs were found haemorrhagic. There was no abscess. The heart and other organs were normal. Histological examination of lungs showed severe bilateral bronchiolitis, diffuse haemorrhagic necrosis, and mononuclear inflammation consisting of dense and diffuse macrophages and lymphocytic infiltrates (Figure 1A,B). In the heart, a moderate inflammation was found in both ventricles, characterized by T lymphocytes and macrophages infiltrates (Figure 1C,D). There was no necrosis. Other organs were normal.

Inflammatory blood markers (CRP: 37 mg/L and PCT: 4.71 µg/L) were increased at admission. Inflammatory cytokines (IFN-β, IL-6, MCP-1, TNF-α) were found increased in post-mortem lungs and heart homogenates in comparison with uninfected patient's blood, indicating cytokine storm (Figure 1E).

Nasal swabbing was performed for viral analysis according to published guidelines from U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A H1N1 (2009)). Cerebrospinal fluid and blood were collected for bacterial analysis. Fresh and frozen lung samples were collected for bacterial and viral analysis, respectively. Frozen heart samples were collected for viral analysis according to European guidelines [10]. No bacterial agent was found by PCR (M-DiaMult™, Diagenode® for Neissera meningitidis, Chla/Myco pneumo r-gene® for Chlamydia pneumonia and Mycoplasma pneumoniae, Bio-Evolution® for Bordetella pertussis) in nasal swabs and bronchial aspiration. Cultures for aerobic or anaerobic bacteria were negatives in blood and cerebrospinal fluid.

After tissue sample lysis, the NucliSENS easyMAG® instrument (BioMérieux, Lyon, France) was used for total nucleic acid extraction, according to the manufacturer's protocol. Two RT-PCR DNA microarray detection systems were used in combination for the detection of human respiratory viruses in the frozen heart and lung samples. Clart Pneumo Vir and Clart FluA Vir kits (Genomica, Madrid, Spain) allowing simultaneous detection of 21 different types and subtypes of human respiratory viruses (influenza A virus [seasonal A/H1N1 and A/H3N2, and new influenza A/H1N1 (2009) virus strains], influenza B virus, influenza C virus, parainfluenza virus 1, 2, 3, 4, 4A and 4B, respiratory syncytial virus A and B, rhinovirus, adenovirus, enterovirus type B, bocavirus, coronavirus E-229, metapneumovirus A and B) were used according to the manufacturer's protocol. Influenza A/H1N1 (2009) virus was detected in all samples (nasal swabs, tracheal swabs, lungs, and heart).

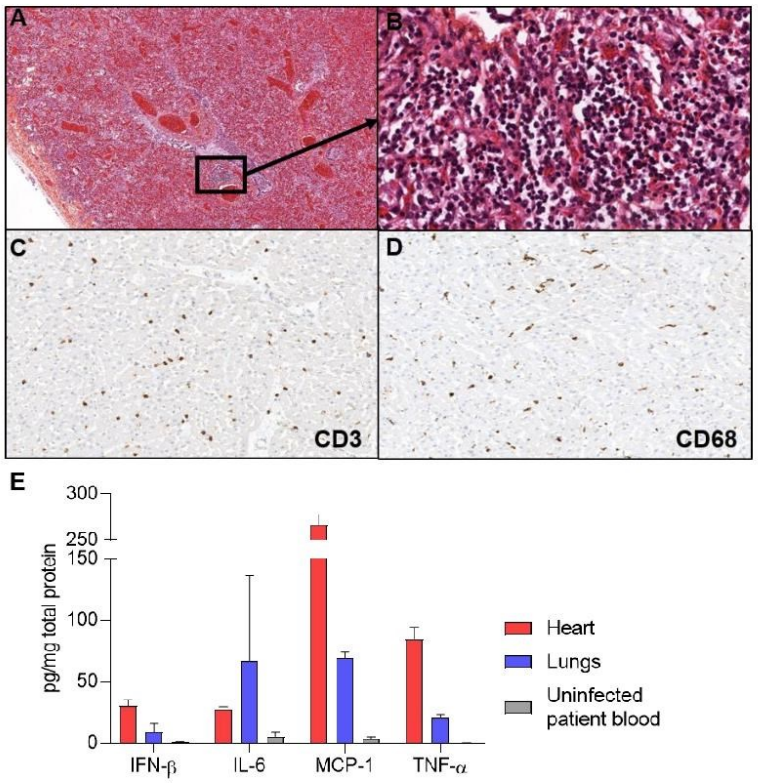


Figure 1. Pneumonia and myocarditis. (**A**) Hematoxylin, eosin, and safran-stained sections show scattered foci of necrosis and inflammation (×40) (**B**) At higher magnification of an inflammatory Figure 400. (**C**) CD3 immunostaining revealed infiltrates of T lymphocytes in the heart (×400). (**D**) CD68 immunostaining revealed macrophages cells infiltrates in the heart (×400). (**E**) Inflammatory cytokines were quantified by ELISA assays, revealing IFN-β, IL-6, MCP-1, and TNF-α increase compared to uninfected patient blood.

Real-time RT-PCR assays (SuperScript III Platinum one-step quantitative RT-PCR system; Invitrogen, Carlsbad, CA) were performed for the identification and quantification of the influenza A/H1N1 virus. The virus was identified in all samples. The viral load was 611 genome copies (gc)/µg of nucleic acids extracted in the lungs, 6 and 20 gc/µg nucleic acids extracted, respectively, in the left ventricle (LV) and the right ventricle (RV) (Figure 2A).

Real-time PCR and RT-PCR assays for herpesviruses (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, and HHV6) and other cardiotropic viruses (PVB19, Enterovirus) were used on frozen heart and lung samples (Clart® Entherpex kit, Genomica, Madrid, Spain; PVB19/HHV6/Enterovirus r-gene®, Argène bioMerieux, Verniolle, France). PVB19 was detected in the heart with 4.4×10^6 gc/µg of extracted DNA in the LV and 3.83×10^6 gc/µg of extracted DNA in the RV, but not in the lungs. HHV6 was detected in the heart but with a non-significant viral load (Ct > 35 or undetermined).

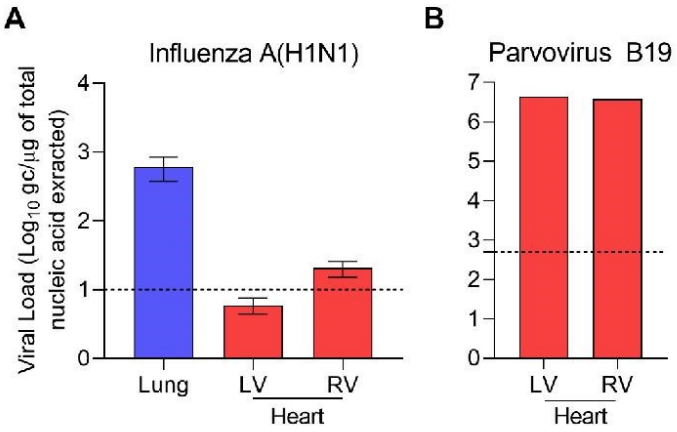


Figure 2. Molecular biology revealed Influenza A(H1N1) and Parvovirus B19 co-infection. (**A**) Influenza load was 611 genome copies (gc)/µg of nucleic acids extracted in the lungs, 6 and 20 gc/µg nucleic acids extracted respectively in the left ventricle (LV) and the right ventricle (RV). (**B**) PVB19 was detected in the heart with 4.4×10^6 gc/µg of extracted DNA in the LV and 3.83×10^6 gc/µg of extracted DNA in the RV. Dotted lines represented threshold for significant replicative activity.

3. Discussion

Thorough viral molecular analysis showed a co-infection PVB19—Influenza A/H1N1 virus as the cause of death of the 5-year old girl. She had no past medical history indicating diminished immunocompetence. The fulminant fatal outcome following a 3-day flu-like syndrome raises the question of an interaction between PVB19, a frequent cardiotropic virus, and influenza A/H1N1 virus, a pulmonary agent.

Influenza A genomic RNA load was significantly higher (>2log10) in the lungs than in the heart and was responsible for pulmonary damages (Figure 2A). Diffuse alveolar damage is the most common pathologic finding in Influenza A/H1N1 infection [7]. Acute necrotizing trachea-bronchitis or bronchiolitis is also a frequent finding [8,9,12–14]. In our case, the microscopic lung findings were in accordance with previously reported Influenza A/H1N1 infections (Figure 1A,B). Influenza A/H1N1 (2009) virus was the only cause of pulmonary damages in our case, as demonstrated by thorough microbiological investigations on fresh and frozen lung samples. Recent recommendations by the ESCMID Study Group for Forensic and Postmortem Microbiology (ESGFOR) advocate for thorough quantitative virological analysis of lung and heart frozen samples, in autopsy cases [11].

Influenza A/H1N1 (2009) has also been reported as a rare cause of myocarditis [7,9,15–17]. Influenza A/H1N1 (2009) was detected by PCR in blood, nasal swabs or formalin fixed paraffin embedded samples [7,15–17]. However, in most reports, the possible presence of other cardiotropic viruses was not investigated.

PVB19 DNA was detected only in the heart (Figure 2B). Interpretation of viral markers remains a difficult task. Viruses can be an incidental finding in autopsy studies of individuals who died of non-cardiac death. In particular, PVB19 and HHV6 have been reported to be frequent bystanders with no clinical consequences [2,3,18]. Distinction between active viral infection in target organs and a bystander virus requires quantification of genomic viral load in frozen samples [3,4]. HHV6 was a bystander virus in our case, since viral load was very low (CT > 35 in left ventricle and undetermined in right ventricle) [19]. We used a published cutoff point of 500 genome copy per microgram of nucleic acids to distinguish between active and latent PVB19 infection [3]. The very high viral load indicates a crucial role of PVB19 in the cause of death, in addition with Influenza A/H1N1-induced pneumonia. High PVB19 load has been shown to be linked to sustained inflammation in

myocarditis and dilated cardiomyopathy [20]. However, comparison with PVB19 loads in normal heart and non-cardiac deaths is lacking in most studies [20].

Our case raises the issue of the interaction of PVB19 and Influenza A/H1N1 viruses in causing pneumonia and myocarditis. PVB19 is a frequent cause of myocarditis, while Influenza A cardiac infection is uncommon [3,15,21]. The link between influenza virus viral load in respiratory samples and disease severity is not clearly established. High Influenza A/H1N1 viral load was found correlated with abnormal findings on chest X-ray and pneumonia in children [22–24]. Moreover, Influenza A/H5N1 virus high viral load was found correlated with high mortality [25]. Large cohort studies are mandatory to better understand the link between Influenza virus viral load and disease severity. Comparisons of Influenza virus viral loads between multiple organs samples, such as in our case, could help in understanding replication fitness and pathogenesis in various cell types.

The low Influenza A/H1N1 genome copy number in cardiac tissues associated with a significant PVB19 genome copy number supports the hypothesis of a reactivated PVB19-induced acute myocarditis during an Influenza A/H1N1 infection, as reported for other viruses associated with PVB19: CMV [26], HHV6 [27], EBV [28], HIV [29], and IAB [30]. However, PVB19 coinfection with Influenza A virus has not been reported. Immunosuppression or modulation are known to be the main factors of PVB19 reactivation [28,31]. In our case, the girl had no diagnosis or medical history indicating diminished immunocompetence. The fulminant fatal outcome suggests a cytokine storm induced by Influenza A/H1N1 infection, which could have triggered the reactivation of a PVB19 latent cardiac infection, as reported in other viral infections [32]. PCT level increase has been reported in severe viral infection with no bacterial agent, such as in our case [33]. However, there is no way to rule out the possibility that the patient became newly infected with PVB19 during an Influenza A infection. Consistently, inflammatory cytokines were increased in the lungs and the heart homogenates, in comparison with uninfected patient's blood (Figure 1E).

In addition to further clinical cases with thorough molecular virological analysis, in vitro studies will be helpful in better understanding the mechanism of viral interactions and the role of viral-induced inflammation, a clinical therapeutic target.

Author Contributions: Conceptualization, L.A. and P.F.; methodology, L.A.; software, D.C.; validation, F.B., L.A. and P.F.; formal analysis, D.C. and A.-L.L.; investigation, D.C., F.B. and A.-L.L.; resources, L.A. and P.F.; data curation, D.C., F.B. and A.-L.L.; writing—original draft preparation, D.C.; writing—review and editing, L.A. and P.F.; visualization, D.C.; supervision, L.A. and P.F.; funding acquisition, L.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was not funded.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Written consent was given by the parents' patient.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical issues (patient identification).

Acknowledgments: We thank the Pathology and Virology department teams of Reims Academic Hospital.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Andréoletti, L.; Lévêque, N.; Boulagnon, C.; Brasselet, C.; Fornes, P. Viral Causes of Human Myocarditis. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **2009**, *102*, 559–568. [CrossRef] [PubMed]
2. Stewart, G.C.; Lopez-Molina, J.; Gottumukkala, R.V.; Rosner, G.F.; Rosner, G.F.; Anello, M.S.; Hecht, J.L.; Winters, G.L.; Padera, R.F.; Baughman, K.L.; et al. Myocardial Parvovirus B19 Persistence: Lack of Association with Clinicopathologic Phenotype in Adults with Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* **2011**, *4*, 71–78. [CrossRef]
3. Bock, C.-T.; Klingel, K.; Kandolf, R. Human Parvovirus B19-Associated Myocarditis. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 1248–1249. [CrossRef] [PubMed]

4. Bock, C.-T.; Düchting, A.; Utta, F.; Brunner, E.; Sy, B.T.; Klingel, K.; Lang, F.; Gawaz, M.; Felix, S.B.; Kandolf, R. Molecular Phenotypes of Human Parvovirus B19 in Patients with Myocarditis. *World J. Cardiol.* **2014**, *6*, 183–195. [CrossRef]
5. Juhasz, Z.; Tiszlavicz, L.; Kele, B.; Terhes, G.; Deak, J.; Rudas, L.; Kereszty, E. Sudden Cardiac Death from Parvovirus B19 Myocarditis in a Young Man with Brugada Syndrome. *J. Forensic Leg. Med.* **2014**, *25*, 8–13. [CrossRef] [PubMed]
6. Mamas, M.A.; Fraser, D.; Neyses, L. Cardiovascular Manifestations Associated with Influenza Virus Infection. *Int. J. Cardiol.* **2008**, *130*, 304–309. [CrossRef]
7. Kuiken, T.; Taubenberger, J.K. Pathology of Human Influenza Revisited. *Vaccine* **2008**, *26*, D59–D66. [CrossRef] [PubMed]
8. Shieh, W.-J.; Blau, D.M.; Denison, A.M.; DeLeon-Carnes, M.; Adem, P.; Bhatnagar, J.; Sumner, J.; Liu, L.; Patel, M.; Batten, B.; et al. 2009 Pandemic Influenza A (H1N1). *Am. J. Pathol.* **2010**, *177*, 166–175. [CrossRef]
9. Gill, J.R.; Sheng, Z.-M.; Ely, S.F.; Guinee, D.G.; Beasley, M.B.; Suh, J.; Deshpande, C.; Mollura, D.J.; Morens, D.M.; Bray, M.; et al. Pulmonary Pathologic Findings of Fatal 2009 Pandemic Influenza A/H1N1 Viral Infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2010**, *134*, 235–243. [CrossRef]
10. Caforio, A.L.P.; Pankuweit, S.; Arbustini, E.; Basso, C.; Gimeno-Blanes, J.; Felix, S.B.; Fu, M.; Helio, T.; Heymans, S.; Jahns, R.; 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.* **2013**, *34*, 2636–2648. [CrossRef]
11. Fernández-Rodríguez, A.; Burton, J.L.; Andreoletti, L.; Alberola, J.; Fornes, P.; Merino, I.; Martínez, M.J.; Castillo, P.; Sampaio-Maia, B.; Caldas, I.M.; et al. Post-Mortem Microbiology in Sudden Death: Sampling Protocols Proposed in Different Clinical Settings. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 570–579. [CrossRef]
12. Mukhopadhyay, S.; Philip, A.T.; Stoppacher, R. Pathologic Findings in Novel Influenza A (H1N1) Virus ("Swine Flu") Infection: Contrasting Clinical Manifestations and Lung Pathology in Two Fatal Cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **2010**, *133*, 380–387. [CrossRef]
13. Harms, P.W.; Schmidt, L.A.; Smith, L.B.; Newton, D.W.; Pletneva, M.A.; Walters, L.L.; Tomlins, S.A.; Fisher-Hubbard, A.; Napolitano, L.M.; Park, P.K.; et al. Autopsy Findings in Eight Patients with Fatal H1N1 Influenza. *Am. J. Clin. Pathol.* **2010**, *134*, 27–35. [CrossRef] [PubMed]
14. Soto-Abraham, M.V.; Soriano-Rosas, J.; Díaz-Quiñónez, A.; Silva-Pereyra, J.; Vazquez-Hernandez, P.; Torres-López, O.; Roldán, A.; Cruz-Gordillo, A.; Alonso-Viveros, P.; Navarro-Reynoso, F. Pathological Changes Associated with the 2009 H1N1 Virus. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 2001–2003. [CrossRef]
15. Ukimura, A.; Izumi, T.; Matsumori, A. Clinical Research Committee on Myoc a National Survey on Myocarditis Associated with the 2009 Influenza A (H1N1) Pandemic in Japan. *Circ. J.* **2010**, *74*, 2193–2199. [CrossRef] [PubMed]
16. Boulagnon, C.; Leveque, N.; Renois, F.; Andreoletti, L.; Fornes, P. Influenza A/H1N1 (2009) Infection as a Cause of Unexpected Out-of-Hospital Death in the Young. *J. Forensic Sci.* **2012**, *57*, 1650–1655. [CrossRef]
17. Hamoudi, A.; Vais, D.; Taqi, V. H1N1 Influenza Causing Fulminant Myocarditis Requiring Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Cureus* **2019**, *11*, e4665. [CrossRef]
18. N'Guyen, Y.; Lesaffre, F.; Metz, D.; Tassan, S.; Saade, Y.; Boulagnon, C.; Fornes, P.; Renois, F.; Andreoletti, L. Enterovirus but Not Parvovirus B19 Is Associated with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy and Endomyocardial CD3, CD68, or HLA-DR Expression: Virus & Inflammatory Marker Detection in DCM. *J. Med. Virol.* **2017**, *89*, 55–63. [CrossRef] [PubMed]
19. Kühl, U.; Lassner, D.; Wallaschek, N.; Gross, U.M.; Krueger, G.R.F.; Seeberg, B.; Kaufer, B.B.; Escher, F.; Poller, W.; Schultheiss, H.-P. Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 in Heart Failure: Prevalence and Treatment: Prevalence and Reactivation of CiHHV-6. *Eur. J. Heart Fail.* **2015**, *17*, 9–19. [CrossRef]
20. Verdonschot, J.; Hazebroek, M.; Merken, J.; Debing, Y.; Dennert, R.; Brunner-La Rocca, H.-P.; Heymans, S. Relevance of Cardiac Parvovirus B19 in Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy: Review of the Literature: Parvovirus B19 in Myocarditis and DCM. *Eur. J. Heart Fail.* **2016**, *18*, 1430–1441. [CrossRef]
21. Kodama, M. Influenza Myocarditis. *Circ. J.* **2010**, *74*, 2060–2061. [CrossRef]
22. Lalueza, A.; Folgueira, D.; Muñoz-Gallego, I.; Trujillo, H.; Laureiro, J.; Hernández-Jiménez, P.; Moral-Jiménez, N.; Castillo, C.; Ayuso, B.; Díaz-Pedroche, C.; et al. Influence of Viral Load in the Outcome of Hospitalized Patients with Influenza Virus Infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **2019**, *38*, 667–673. [CrossRef]
23. Li, C.-C.; Wang, L.; Eng, H.-L.; You, H.-L.; Chang, L.-S.; Tang, K.-S.; Lin, Y.-J.; Kuo, H.-C.; Lee, I.-K.; Liu, J.-W.; et al. Correlation of Pandemic (H1N1) 2009 Viral Load with Disease Severity and Prolonged Viral Shedding in Children. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1265–1272. [CrossRef] [PubMed]
24. Pronier, C.; Gacouin, A.; Lagathu, G.; Le Tulzo, Y.; Tadié, J.-M.; Thibault, V. Respiratory Influenza Viral Load as a Marker of Poor Prognosis in Patients with Severe Symptoms. *J. Clin. Virol.* **2021**, *136*, 104761. [CrossRef]
25. De Jong, M.D.; Simmons, C.P.; Thanh, T.T.; Hien, V.M.; Smith, G.J.D.; Chau, T.N.B.; Hoang, D.M.; Van Vinh Chau, N.; Khanh, T.H.; Dong, V.C.; et al. Fatal Outcome of Human Influenza A (H5N1) Is Associated with High Viral Load and Hypercytokinemia. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 1203–1207. [CrossRef]
26. Thuy, H.T.D. Co-Infection of Parvovirus B19, CMV and BK Virus after Renal Transplantation. *Int. J. Clin. Med. IJCM* **2018**, *9*, 820–825. [CrossRef]
27. Kühl, U.; Pauschinger, M.; Noutsias, M.; Seeberg, B.; Bock, T.; Lassner, D.; Poller, W.; Kandolf, R.; Schultheiss, H.-P. High Prevalence of Viral Genomes and Multiple Viral Infections in the Myocardium of Adults With "Idiopathic" Left Ventricular Dysfunction. *Circulation* **2005**, *111*, 887–893. [CrossRef] [PubMed]

28. Karrasch, M.; Felber, J.; Keller, P.M.; Kletta, C.; Egerer, R.; Bohnert, J.; Hermann, B.; Pfister, W.; Theis, B.; Petersen, I.; et al. Primary Epstein-Barr Virus Infection and Probable Parvovirus B19 Reactivation Resulting in Fulminant Hepatitis and Fulfilling Five of Eight Criteria for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Int. J. Infect. Dis.* **2014**, *28*, 143–146. [CrossRef] [PubMed]
29. Shehi, E.; Ghazanfar, H.; Fortuzi, K.; Gonzalez, E.; Zeana, C. A Rare Case of Parvovirus B19 Infection Manifesting as Chronic Aplastic Anemia and Neutropenia in a Human Immunodeficiency Virus-Infected Patient. *Cureus* **2020**, *12*, e12174. [CrossRef]
30. Krell, S.; Adams, I.; Arnold, U.; Kalinski, T.; Aumann, V.; König, W.; König, B. Influenza B Pneumonia with Staphylococcus Aureus Superinfection Associated with Parvovirus B19 and Concomitant Agranulocytosis. *Infection* **2003**, *31*, 353–358. [CrossRef]
31. Escobar-Sevilla, J.; Bustos Merlo, A.; Garcia Martínez, C.; Mediavilla Garcia, J.D. Severe Refractory Anaemia and Fever of Unknow Origin: Human Parvovirus B19 Reactivation. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.* **2020**, *7*, 001596. [CrossRef] [PubMed]
32. Short, K.R.; Veeris, R.; Leijten, L.M.; van den Brand, J.M.; Jong, V.L.; Stittelaar, K.; Osterhaus, A.D.M.E.; Andeweg, A.; van Riel, D. Proinflammatory Cytokine Responses in Extra-Respiratory Tissues During Severe Influenza. *J. Infect. Dis* **2017**, *216*, 829–833. [CrossRef] [PubMed]
33. Gautam, S.; Cohen, A.J.; Stahl, Y.; Valda Toro, P.; Young, G.M.; Datta, R.; Yan, X.; Ristic, N.T.; Bermejo, S.D.; Sharma, L.; et al. Severe Respiratory Viral Infection Induces Procalcitonin in the Absence of Bacterial Pneumonia. *Thorax* **2020**, *75*, 974. [CrossRef] [PubMed]

Annexe 8 : Fulminant Myocardial Involvement in Neonatal Echovirus-induced Sepsis. Two Autopsy Cases.

Fulminant Myocardial Involvement in Neonatal Echovirus-induced Sepsis. Two Autopsy Cases

Domitille Callon, MD,†, Aurélien Guedra,† Anne-Laure Lebreil, MSc,* Caroline Rambaud, PhD,‡ Paul Fornés, PhD,*† and Laurent Andreoletti, PhD*§*

Abstract: Group-B Enteroviruses, such as Echoviruses, are a common cause of infections in neonates but fatal myocarditis during Echovirus-induced sepsis have been rarely reported. We report on 2 cases of neonatal Echovirus-related sepsis with myocarditis. Fatal cardiorespiratory failure occurred in both cases. Autopsies and thorough histologic and microbiologic investigations evidenced Echoviruses 5- and 11-induced myocarditis as the cause of death.

Key Words: enterovirus, neonates, septicemia, myocarditis

(*Pediatr Infect Dis J* 2022;41:148–150)

Downloaded from http://journals.lww.com/pidj by BhDMf5ePHKav1zEoum1tQfN4a+kJLhEZgbsIHo4XMi0hCywCX1AWnYQp/IlQrHD3i3D0OdRyi7TvSFl4Cf3VC1y0abggQZXdtwnfKZBYtws=/Jyr7Br on 01/12/2022

Most group-B Enteroviruses (picornaviridae) (EV-B), such as Echoviruses, are a common cause of moderate and self-limiting infections in pediatric patients, but severe disease such as sepsis, myocarditis, hepatitis and meningoencephalitis have been reported in neonates.[1] Autopsy with thorough virologic investigations are rarely performed, limiting understanding of Echovirus pathogenesis in neonates.[2] Genotyping enterovirus strains as well as describing the inflammatory response involved could be useful for the future discussion of antiviral or immunomodulatory therapies in newborns.

CASES PRESENTATION

Case 1

A 24-day-old male newborn with no past medical history was found in cardiac arrest by his parents at home. A few days before his death, his parents have reported regurgitations and discomfort following bottle-feeding. Cardiorespiratory functions were not restored despite intensive care. Blood inflammatory markers were not increased [C-reactive protein < 4 mg/L (<10 mg/L) and procalcitonin: 0.09 µg/L (0.15–2 µg/L)]. A nasopharyngeal swab was found positive for SARS-CoV-2 RNA raising the possibility of a pediatric case of COVID-19. No bacterial agent was found in the peripheral blood using classical bacterial culture assays.

No visceral lesions were found at autopsy and histology. Immunohistochemistry for T-lymphocytes (CD3) and macrophages (CD68) revealed significant cardiac mononuclear cell infiltrates (Fig. 1A–D). Viral RT-PCR revealed enterovirus RNA genomes in heart and lungs frozen samples. RT-PCR for SARS-CoV-2 RNA was negative in the heart, lungs and blood. Enterovirus RNA load was high with 377×10^4 cp/µg of RNA extracted in the heart and 104×10^4 cp/µg RNA extracted in the lungs. The same Echovirus 5 strain was identified in the heart and lungs, by sequencing of viral capsid protein 1 gene (VP1) [Fig. 1E; Genbank accession numbers: MT520170 (heart) and MT520171 (lungs)].[3] Nucleotide sequences percent identities were 75%, with an Echovirus 5 isolate (GenBank accession no. JN092120.1). Sequence identities between our virus isolate and the previously Echovirus 5 isolate demonstrated a homologous serotype.

Case 2

A premature (34 weeks of gestation) male neonate presented with respiratory distress at birth. Despite intensive care, the neonate continued to show signs of respiratory distress. Inflammatory markers were not increased [C-reactive protein< 0.3 mg/L (<10 mg/L) and procalcitonin: 0.14 ng/mL (0.15–2 µg/L)]. Rectal temperature was 36.5 °C. No bacterial agent was found in the peripheral blood or gastric liquid using classical bacterial culture assays.

Five days after birth, he presented with an abdominal bloating with externalization of fresh blood through nasogastric tube. Imaging did not reveal any perforation nor radiologic abnormalities. Transthoracic ultrasound revealed hypocontractility of the left ventricle. The following day, the neonate had a fatal cardiorespiratory arrest.

The autopsy revealed shock-induced diffuse necrotizing enterocolitis. Histology was otherwise normal. Immunohistochemistry for T-lymphocytes (CD3) and macrophages (CD68) revealed significant mononuclear cells infiltrates in the heart (Fig. 1A–D). Viral RT-PCR revealed enterovirus RNA in heart samples, cerebrospinal fluid and plasma. Enterovirus RNA load was high, with 1×10^6 cp/µg of RNA extracted in the heart. An Echovirus 11 strain was identified in the heart and plasma by sequencing of viral capsid protein 1 gene (VP1) [Fig. 1E; Genbank accession numbers: MK281350 (heart) and MK281352 (plasma)].[3] Nucleotide sequences percent identities were 96%, with an Echovirus 11 strain 10S1 (GenBank accession no. MN749159.1). Sequence identities between our virus isolate and the Echovirus 11 strain demonstrated a homologous serotype.

DISCUSSION

We reported on 2 autopsy-proven myocarditis during neonatal Echovirus sepsis cases. In both cases, immunohistochemistry revealed significant infiltrates of T-lymphocytes and macrophages in both ventricles, whereas no fever nor increased inflammatory markers were present (Fig. 1A–D). Only group-B enterovirus RNA was found in heart frozen samples of both cases. Genotyping of VP1 region identified genomic RNA sequences of Echovirus 5 and 11 strains (Fig. 1E).[3] Viral transmission probably occurred by respiratory route in the first case, since Echovirus 5 was also detected in lungs samples. In the second case, since lungs samples were negative for Echovirus 11 and onset of symptoms was early at birth, maternal transmission is more likely. In the second case, the diffuse necrotizing enterocolitis was a complication of prematurity, and unlikely caused by the Echovirus 11-induced sepsis.

Accepted for publication June 27, 2021

From the *University of Reims Champagne Ardenne, Cardiovir EA-4684; †Academic Hospital of Reims, Robert Debré, Pathology Department, Reims; ‡Department of Pathology and Legal Medicine, Raymond Poincaré Hospital, APHP, Garches; and §Academic Hospital of Reims, Robert Debré, Virology Department, Reims, France.

The authors have no funding or conflicts of interest to disclose.

Address for correspondence: Domitille Callon, MD, Pathology department and EA-4684 Cardiovir, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex, France. E-mail: dcallon@chu-reims.fr.

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0891-3668/22/4102-0148
DOI: 10.1097/INF.0000000000003276

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

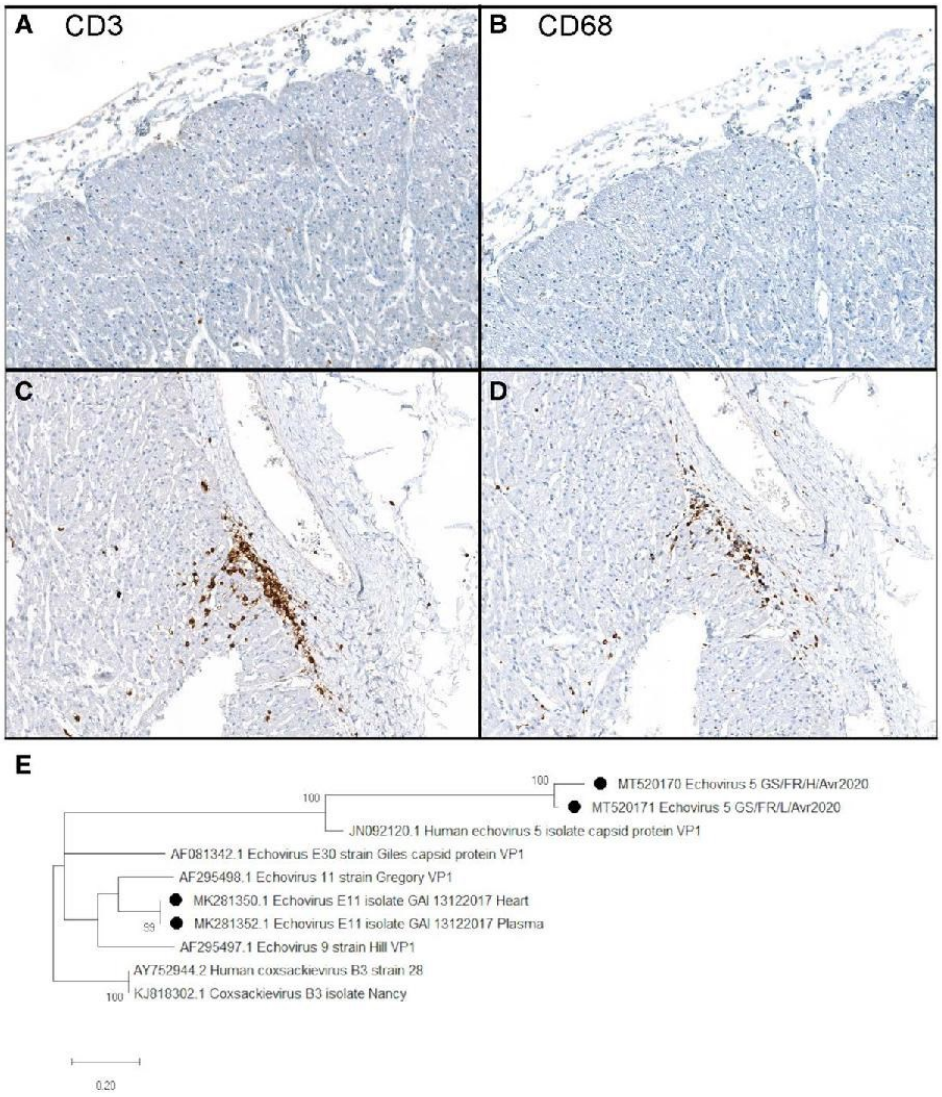


FIGURE 1. Inflammatory cells infiltrates in the heart revealed by immunohistochemistry. A and B: CD3 and CD68 positive cells were rare in the heart of a neonate who died of sudden unexpected death with no bacterial nor viral agents. C and D: CD3 and CD68 positive cells infiltrates were found in heart of the reported 2 neonate cases. E: Phylogenetic analyses of Echovirus strains identified in heart, lungs, CSF or plasma of the 2 cases. Analyses were performed with MegaX software using Maximum Likelihood method and Kimura 2-parameter model. Case 1: MT520170 (heart) and MT520171 (lungs); Case 2: MK281350 (heart) and MK281352 (plasma). CSF, cerebrospinal fluid. full color online

Recently, the European Study Group for Forensic and Postmortem Microbiology published an article showing that myocarditis represents almost 3% of all sudden pediatric deaths.[2] Enterovirus and parvovirus were the most common viruses.[2] While most pediatric Echovirus infections are mild and self-limiting, severe disease such as a viral sepsis, myocarditis, hepatitis and meningoencephalitis can occur.[1] Echoviruses 5 and 11 infections have rarely been reported as causes of myocarditis or death in neonates. To our knowledge, this is the first autopsy report with complete histology and virologic analyses of Echoviruses 5- and 11-induced myocarditis and sepsis. However, autopsies are rarely performed, limiting understanding of echovirus pathogenesis in

© 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

neonates. Moreover, thorough virologic analyses such as viral load quantification or genotyping of strains are rarely performed. In our first reported case, SARS-CoV-2 genome was detected in a nasal swab raising the possibility of a neonatal case of COVID-19, which is particularly rare.[4] However, no SARS-CoV-2 genome was detected elsewhere by molecular assays, and no COVID19-related lesion was found in the lungs. Without a complete autopsy and virologic investigations on frozen tissue samples, this case might have been misdiagnosed as a COVID19-induced death in a neonate.

In both cases, no fever nor increased inflammatory markers were present, raising the question of Echoviruses 5- and 11-induced particular inflammatory pathways in neonates.[1,5] Echovirus-induced cardiac dysfunctions in both cases might explain fatal rapid outcome and refractory shock.[1,6] Cardiac immunohistochemistry to confirm lymphocytes (CD45, CD3, CD4, CD8, CD20 and/or CD79) and macrophages (CD68) infiltrates is mandatory for the diagnosis of fulminant myocarditis.[7] Necrosis might be absent, but dense inflammatory infiltrates of T-lymphocytes and macrophages can be found.[7] Increased inflammatory cytokines, cardiac macrophages infiltrates and group-B enteroviruses are known to be directly associated with cardiac failure.[5,8,9] Notably, type 1 interferon has been recently found to be a key pathway in Echovirus 11 pathogenesis in mice.[10] Further investigations of Echoviruses-induced inflammatory pathways in the human peripheral blood or cardiac cells might be of major interest to design further specific immunomodulatory therapeutic strategies.

CONCLUSIONS

Echoviruses 5- and 11-induced myocarditis during neonatal sepsis are uncommon but should be considered as a cause of fulminant outcome in neonates. Autopsy and thorough viral investigations on frozen tissues are mandatory for a better understanding of Echoviruses pathogenesis and for developing new direct or immunomodulatory therapeutic strategies in enteroviral neonatal sepsis.

REFERENCES

1. Chuang YY, Huang YC. Enteroviral infection in neonates. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019;52:851–857.
2. Neagu O, Rodríguez AF, Callon D, et al. Myocarditis presenting as sudden death in infants and children: a single centre analysis by ESGFOR study group. *Pediatr Dev Pathol*. 2021;24:327–336.
3. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2698–2704.
4. Karabay M, Çınar N, Karakaya Suzan Ö, et al. Clinical characteristics of confirmed COVID-19 in newborns: a systematic review [published online ahead of print November 19, 2020]. *J Matern Fetal Neonatal Med.* doi: 10.1080/14767058.2020.1849124.
5. Verboon-Maciolek MA, Thijsen SF, Hemels MA, et al. Inflammatory mediators for the diagnosis and treatment of sepsis in early infancy. *Pediatr Res.* 2006;59:457–461.
6. Nathan M, Walsh R, Hardin JT, et al. Enteroviral sepsis and ischemic cardiomyopathy in a neonate: case report and review of literature. *ASAIO J.* 2008;54:554–555.
7. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, et al; European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. 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.* 2013;34:2636–48, 2648a.
8. Imanaka-Yoshida K. Inflammation in myocardial disease: from myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Pathol Int.* 2020;70:1–11.
9. Torres-Torres S, Myers AL, Klatte JM, et al. First use of investigational antiviral drug pocapavir (v-073) for treating neonatal enteroviral sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34:52–54.
10. Wells AI, Grimes KA, Kim K, et al. Human FcRn expression and Type I Interferon signaling control Echovirus 11 pathogenesis in mice. *PLoS Pathog.* 2021;17:e1009252.

© 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Impact des ARN génomiques des entérovirus-B tronqués en région 5'non-codante sur leur pathogénicité et sur la réponse interféron de type 1 dans les cardiomyocytes et les cellules bêta-pancréatiques *in vivo* et *in vitro*

Des ARN génomiques d'entérovirus-B tronqués en région 5'terminale non codante (EVB-TD) ont été associés à des myocardites aigues, des cardiomyopathies dilatées chroniques et au diabète de type 1. La pathogenèse n'est pas élucidée. Nous avons étudié chez la souris DBA/2J et dans des cultures de cardiomyocytes et de cellules bêta pancréatiques, l'impact de ces EVB-TD sur les activités de réplication virale, la réponse interféron de type 1 (IFN-1) et les fonctions des cellules cibles. Au cours de l'infection par le virus Coxsackie B3/28 (CVB3) nous avons montré l'émergence et le maintien d'une population virale majoritaire tronquée de 50 nucléotides en région 5'terminale (CVB3-TD50) aux phases aigue puis persistante, dans le cœur et le pancréas, avec respectivement une dégradation de la dystrophine et une diminution de l'expression d'insuline. La transfection d'ARN viraux synthétiques CVB3-TD50 chez la souris et dans des cardiomyocytes humains nous a permis de démontrer leur capacité à moduler l'activation de la voie IFN-1. De plus, leur transfection dans les cellules bêta pancréatiques a montré leur rôle dans la diminution du métabolisme de l'insuline. En conclusion, nos résultats montrent que l'émergence précoce et le maintien de formes majoritaires et réplicatives de CVB3-TD50 module l'activation de la voie IFN-1, favorisant le développement d'une infection persistante associée à un dysfonctionnement des cellules cardiaques et bêta pancréatiques.

Entérovirus, myocardite, diabète, interférons, pathogenèse

Impact of 5'terminally deleted RNA forms of group-B enterovirus on their pathogenicity and on type 1 interferon response in cardiomyocytes and pancreatic beta cells in vivo and in vitro

Enterovirus-B genomic RNA deleted in the 5'terminal non-coding region (EVB-TD) have been associated with acute myocarditis, chronic dilated cardiomyopathy and type 1 diabetes. The pathogenesis is not elucidated. In DBA/2J mice and in cultured cardiomyocytes and pancreatic beta cells, we studied the impact of these EVB-TD on viral replication activities, type 1 interferon (IFN-1) response and target cell functions. During infection with a Coxsackievirus B3/28 (CVB3), we showed the emergence and maintenance of a dominant viral population deleted of 50 nucleotides in the 5'terminal region (CVB3-TD50) at acute and persistent phases, in the heart and pancreas, with respectively a degradation of dystrophin and a decrease in insulin expression. The transfection of synthetic CVB3-TD50 viral RNA in mice and in human cardiomyocytes demonstrated their capacity to modulate the activation of the IFN-1 pathway. In addition, their transfection into pancreatic beta cells showed their role in decreasing insulin metabolism. In conclusion, our results show that the early emergence and maintenance of dominant and replicative forms of CVB3-TD50 modulates the activation of the IFN-1 pathway, leading to the development of a persistent infection associated with cardiac and pancreatic beta cell dysfunctions.

Enterovirus, myocarditis, diabetes, interferons, pathogenesis

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

Spécialité : Virologie

Université de Reims Champagne-Ardenne

CardioVir – EA 4684

51 rue Cognacq Jay 51095 Reims