

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE LILLE II

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

Pour l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Virologie

Infection à Coxsackievirus B4 et Prévention

Présentée et soutenue par :

Famara SANE

Le 12 décembre 2012

Devant le jury composé de :

M. Jean DUBUISSON

Mme Sandrine CASTELAIN

M. Bruno BLONDEL

M. Didier HOBBER

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse



Université Lille 2
Droit et Santé




Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ici les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail de thèse.

- *Au Professeur Didier HOBBER, mon directeur de Thèse, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a fait confiance. Sa disponibilité, ses conseils avisés, son expérience et sa rigueur ont permis la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*
- *A tout le personnel du Laboratoire de Virologie et en particulier à Delphine, Pierre-Emmanuel, Anne, Ilka, Swan, Laura, Sophie, Mouna, Marie-Christine, Jean-Marie, Judith, Manu, Françoise, Agathe, Bernadette, Azizul, Valérie, Karéna, Kazali, Pierre...pour l'accueil chaleureux, la bonne humeur, les conseils et la patience.*
- *Au Professeur Marie-Bénédicte ROMOND et à tout le personnel de son équipe (BIFINOVE), en particulier à Frédérique, Michel, Soune, Angélo, Serge, Corinne. Vos qualités scientifiques et humaines m'ont été indispensables. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.*
- *A l'équipe du Professeur Didier Viaud (Stress Périnatal- Université Lille 1) et en particulier au Dr Christine Laborie. Toute ma gratitude pour le travail réalisé ensemble.*
- *Au Professeur Jean DUBUISSON. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de présider cette soutenance de Thèse.*
- *Au Dr Sandrine CASTELAIN pour l'honneur que vous me faite en acceptant de juger ce travail et d'en être rapporteur.*
- *Au Dr Bruno BLONDEL pour l'honneur que vous me faite en acceptant de juger ce travail et d'en être rapporteur.*

Je ne saurais terminer ces remerciements sans exprimer ma profonde gratitude à mes parents pour le soutien et la patience, à ma famille et à tous mes proches.

Résumé

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie chronique multifactorielle. Les infections entérovirales, en particulier à Coxsackievirus du groupe B (CVB), et notamment CVB4, transmises par voie digestive, constituent le facteur de risque le plus souvent évoqué dans la littérature. Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont proposés pour expliquer cette relation entre CVB4 et diabète de type 1. Il s'agit, entre autres, du tropisme préférentiel de CVB4 pour les ilots et les cellules β pancréatiques et l'inflammation qui s'ensuit, de la persistance du virus au niveau des cellules infectées qui pourrait constituer un facteur déterminant dans le processus d'altération des cellules endocrines, de l'exacerbation possible de l'infection par des d'anticorps facilitateurs ou encore du mimétisme moléculaire entre les auto-antigènes et les antigènes viraux. Par ailleurs des auteurs ont montré que la cause de la déplétion des cellules β chez des souris infectées par la souche diabétogénique CVB4E2 est un défaut de régénération plutôt qu'une destruction directe de ces cellules par le virus. La présence de constituants entéroviraux dans les cellules ductales du pancréas de patients diabétiques a été observée. Le diabète de type 1, qui serait l'expression finale d'un long processus, survient généralement chez des sujets jeunes, c'est pourquoi l'hypothèse que le tissu pancréatique jeune serait plus permissif aux infections à CVB4 n'est pas exclue. La prévention des infections virales reste le meilleur moyen de protéger les individus contre les maladies qu'elles provoquent. Un intérêt particulier est aujourd'hui accordé à la mise en évidence et à la caractérisation d'inhibiteurs antiviraux à large spectre. L'absence d'allaitement maternel est associé à un risque plus élevé de diabète de type 1, mais la nature du ou des facteurs du lait conférant une protection est mal connue, et l'activité anti-CVB4 du lait maternel n'a pas été étudiée jusqu'à présent.

Objectifs : Nous avons émis l'hypothèse que CVB4 pouvait infecter des cellules humaines précurseurs de cellules endocrines, impliquées dans la régénération des îlots. L'infection de ces cellules par CVB4E2 et ses conséquences ont été étudiées ; nous avons utilisé des cellules humaines précurseurs canaux primitives et la lignée continue de cellules Panc-1, dont la différenciation *in vitro* est possible. La permissivité au CVB4 du tissu pancréatique selon l'âge a été étudiée *ex vivo* chez le rat et l'existence d'inhibiteurs antiviraux à large spectre est notamment explorée dans l'intestin de souris. L'activité anti-CVB4 du lait maternel susceptible de protéger, à un âge critique, le jeune enfant vis-à-vis d'un virus diabétogène a été étudiée *in vitro* et l'hypothèse que le lait humain pourrait prévenir le déclenchement du DT1 chez la souris NOD a également été évaluée *in vivo*.

Résultats : Les cellules primitives canaux humaines (cellules ductales), ainsi que les cellules de la lignée Panc-1, sont infectables par CVB4 (production de particules virales et détection de protéines et d'ARN viral intracellulaires). Une infection persistante des cellules Panc-1 a été obtenue, avec présence de protéine virale VP1 (IFI) dans moins d'1% des cellules seulement mais détection d'ARN viral dans davantage de cellules (>50%). Une persistance de type « état porteur » a été mise en évidence après élimination du virus des cultures à l'aide d'immun-sérum anti-CB4 neutralisant. Il a été observé que CVB4 altérerait la synthèse du marqueur de différenciation PDX-1 (ARNm détecté par RT-PCR) dans les cellules Panc-1 ainsi que leur différenciation en structure ressemblant à des îlots (Islet-like cell Aggregates).

L'étude des cultures organotypiques de pancréas de rats a révélé que la viabilité tissulaire était en moyenne de 7 jours. Les cultures de pancréas étaient infectables par CVB4 et l'évaluation par RT-PCR quantitative des titres viraux a montré que la réplication virale était relativement identique dans les cultures d'organes provenant de rats âgés (8 mois), ou d'animaux plus jeunes (1 semaine et 40 jours), et de fœtus (21 jours de gestation). L'examen immunohistochimique (VP1) des coupes d'organes a montré que l'infection était préférentiellement localisée au niveau des îlots de Langerhans.

L'exploration du milieu intestinal de souris a abouti à la mise en évidence et à la caractérisation d'un inhibiteur antiviral actif vis-à-vis du CVB4, CVB3 et du poliovirus. Cet inhibiteur, d'un poids moléculaire estimé à 89 kDa, n'a pas d'activité vis-à-vis du virus EMCV. Une activité anti-CVB4 a été mise en évidence dans le lait maternel et le sérum. Cette activité a été retrouvée dans la fraction aqueuse du lait et elle est significativement plus importante dans le colostrum par rapport au lait de transition ($p < 0,05$) ou au lait mature ($p < 0,05$). Une variation interindividuelle a été constatée avec un titre neutralisant du lait faible ou nul chez des donneuses. Par ailleurs, il a été constaté que les titres sont significativement ($p < 0,0001$) plus élevés dans une zone du globe à forte prévalence entérovirale (République du Congo). Il n'y avait pas de corrélation entre les titres d'activité anti-CVB4 du lait et du sérum. La déplétion en IgA à l'aide de jacaline démontrait que l'effet neutralisant anti-CVB4 du lait était lié à cet isotype d'immunoglobulines.

La prise de lait humain par les souris NOD a conduit à une diminution significative ($p < 0,001$) de l'incidence du DT1 dans ce modèle. Des modifications notables de la flore microbienne intestinale ont été relevées, avec des variations sigmoïdiennes au cours du suivi des différentes populations bactériennes étudiées. Deux marqueurs bactériens potentiellement

impliqués dans la survenue du diabète de type 1 chez la souris NOD ont cependant été identifiés : *Enterorhabdus* en tant que marqueur potentiellement bénéfique et insensible à la prise de lait, *A. viridans* en tant que marqueur potentiellement délétère mais sensible à la prise de lait.

Conclusion : Nos travaux concernant l'infection à CVB4 des cellules ductales humaines et ses conséquences permettent d'argumenter une nouvelle hypothèse concernant la pathogenèse viro-induite du DT1. Le modèle de culture organotypique de rat permettra de mieux connaître l'infection du pancréas par CVB4. L'isolement d'inhibiteurs antiviraux dans le milieu intestinal murin devrait permettre d'envisager de nouvelles approches préventives vis-à-vis des virus concernés. L'activité inhibitrice du virus mise en évidence dans le lait, suggère que l'allaitement est un moyen de lutter contre l'infection par voie digestive des nouveaux-nés et de limiter ainsi le risque de développer un DT1 chez les enfants. L'identification /caractérisation de marqueurs prédictifs du déclenchement du DT1 devrait permettre de comprendre les mécanismes de la protection contre le diabète conférée par le lait humain chez la souris NOD.

LISTE DES ABREVIATIONS

ARN	Acide ribonucléique
ADN	Acide désoxyribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumine
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
CK19	Cytokeratin 19
DBA	Dilute Brown non-Agouti (souris)
DMEM	Dulbecco's modifier Eagle medium
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DNA	Desoxyribonucleic acid (= ADN)
ECP	Effet cytopathogène
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
FBS	Fetal bovine serum (= SVF)
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Hep-2	Human epidermoid cancer cells
ICA	Islet-like Cell Aggregate
ICR	Institute for Cancer Research (souris)
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
MEM	Eagle's essential medium (= Milieu essential minimum)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffer Saline
RNA	Ribonucléic acid (= ARN)
RT-PCR	Retrotranscription-PCR
SCM	Serum Containing Media
SFM	Serum Free Media
TCID ₅₀	Tissue Culture Infective Dose 50%

I – INTRODUCTION

I.1 - Coxsackievirus B et diabète de type 1

Les Coxsackievirus du groupe B (CVB) et/ou leurs constituants sont retrouvés dans le sang et le pancréas de patients atteints d'un diabète de type 1 (DT1). Les infections à CVB s'accompagnent d'une activation du système immunitaire inné et adaptatif, avec comme conséquence probable une induction ou une aggravation de processus auto-immuns. Les infections persistantes et/ou répétées à CVB des cellules β pancréatiques, la production d'interféron alpha et de protéines inflammatoires qui en résulte, associées à une prédisposition génétique, pourraient induire une activation « en passant » de lymphocytes T effecteurs et une réponse auto-immune dirigée contre les autoantigènes des cellules β à travers le mécanisme de mimétisme moléculaire. En outre, l'infection des monocytes par des CVB, dépendante d'anticorps, au même titre que l'infection du thymus pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse viro-induite du DT1. A contrario des effets délétères des CVB, des études chez l'animal ont montré que ces virus, dans certaines conditions expérimentales, peuvent inhiber le développement du DT1. Le rôle des CVB dans les processus auto-immuns tels que le DT1 est complexe. Des mécanismes mutuellement non exclusifs peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse du diabète de type 1 induite ou aggravée par les CVB. Ces mécanismes, et notamment l'altération des cellules β provoquées par les CVB sont présentés dans des articles de notre équipe.

Sane F, Moumna I, Hober D. Group B Coxsackieviruses and Autoimmunity: focus on Type 1 Diabetes. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 7(3), 357 – 366 (2011).

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

Hober D and **Sane F**. **Enteroviruses and type 1 diabetes.** *BMJ.* **342 :c7072 (2011).**

Hober D and **Sane F**. **Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes.** *Discov. Med.* **10(51) : 151-160 (2010).**

Jaïdane H, Sauter P, **Sane F**, Goffard A, Gharbi J, Hober D. **Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship.** *Rev. Med. Virol.* **20(5) :265-280 (2010).**

Jaïdane H, **Sane F**, Gharbi J, Aouni M, Romond MB, Hober D. **Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models.** *Diabetes Metab Res Rev.* **25(7):591-603 (2008).**

Une meilleure compréhension des processus liés aux infections à CVB à l'origine d'une induction/aggravation du DT1 ou d'une protection vis-à-vis de la maladie permettra l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives. C'est dans le cadre de la compréhension de la pathogenèse du DT1 induite par les CVB et de la prévention des infections à CVB que s'inscrivent nos travaux.

I.2 – Infection à CVB4 et pancréas

I.2.1 – Cosaxckievirus B

Les CVB appartiennent à l'espèce Entérovirus Humain B, comprenant 6 sérotypes et au genre *Enterovirus*. Ce sont de petits virus nus, à ARN de polarité positive, appartenant à la famille

des *Picornaviridea*. Les entérovirus sont regroupés en 10 espèces (Tableau 1). Leur génome, de 7500 bases en moyenne, code pour 7 protéines non structurales et 4 protéines structurales (VP1, VP2, VP3 et VP4) (Figure 1). Ils sont principalement transmis selon un mode fécal-oral, mais la voie respiratoire est également évoquée (Pallansch et al. 2007 ; Oberst et al.2008).

Genus	Species	Serotypes
Enterovirus	<i>Human enterovirus A</i>	CV-A, EV-A, SV and BA13
	<i>Human enterovirus B</i>	CV-B, CA9, EV-B, SA5, Echo
	<i>Human enterovirus C</i>	PV, CV-A, EV-C
	<i>Human enterovirus D</i>	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111, EV-D120
	<i>Bovine enterovirus</i>	BEV-A, BEV-B
	<i>Porcine enterovirus B</i>	PEV-9, PEV-10, PEV-14, PEV-15, OEV-1.
	<i>Simian enterovirus A</i>	SEV-A1
	<i>Human rhinovirus A</i>	HRV-A (77 serotypes)
	<i>Human rhinovirus B</i>	HRV-B (25 serotypes)
	<i>Human rhinovirus C</i>	HR-C (C1-C50)

Tableau 1 : Classification des Entérovirus

Les CVB sont souvent responsables de manifestations cliniques bénignes de type syndrome grippal. Ils sont cependant associés dans certains cas à des manifestations cliniques plus graves telles que des infections respiratoires, des myocardites, des méningites et des pathologies chroniques comme la cardiomyopathie dilatée et le diabète de type 1 (DT1) (Pallansch et al. 2007). Un certain nombre de données épidémiologiques, cliniques et expérimentales permettent d'évoquer une association entre les infections entérovirales en général et à CVB en particulier et le DT1. Il s'agit, entre autres, de la détection plus fréquente de l'ARN entéroviral dans divers organes de patients diabétiques par rapport aux sujets contrôles ; de la présence plus fréquente d'anticorps anti-CVB chez les patients diabétiques comparativement aux sujets contrôles ; de l'isolement d'une souche de CVB (CVB4E2) du pancréas d'un patient décédé d'une acidocétose diabétique, capable d'induire un diabète chez la souris ; de la preuve *in vitro* de l'infection persistante des cellules β par le CVB4 (Sane et al. 2011 ; Hober and Sané 2010 ; Hober and Sauter 2010). Il ressort de ces études que les CVB apparaissent comme un facteur étiologique ou aggravant du DT1.

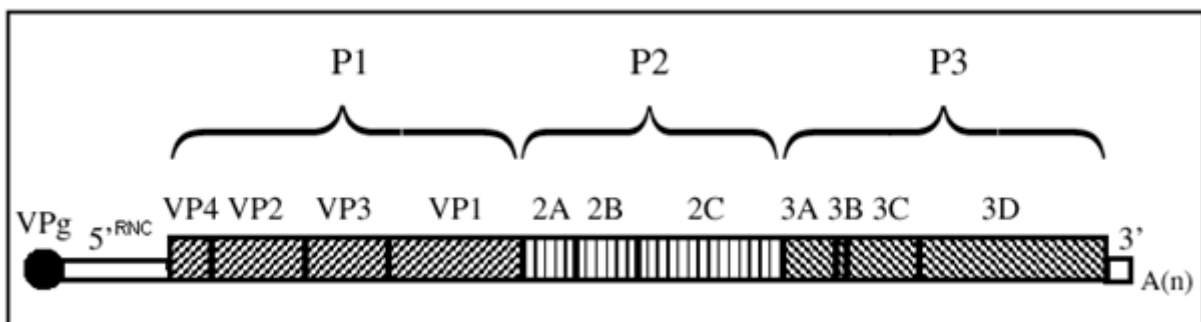


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation du génome d'un entérovirus. La région 5' non codante (RNC) est conservée parmi les différents entérovirus. P1, P2 et P3 sont les produits du clivage protéolytique initial de la polyprotéine (Sane et al. 2008).

Cependant, bien qu'elles aient suscité un certain nombre de critiques relatives à la méthodologie adoptée, quelques études rétrospectives n'ont pu mettre en évidence cette association entre infections entérovirales et DT1 (Haverkos et al. 2003 ; Green et al. 2004).

I.1.2 – Infection des cellules β par les Coxsackievirus B

Les mécanismes de la pathogenèse viro-induites du DT1 restent encore à élucider. Plusieurs mécanismes sont à ce jour évoqués et explorés dans la littérature spécialisée. Il s'agit du mimétisme moléculaire et du phénomène d'«activation en passant», de la perturbation de la fonction thymique, de l'exacerbation de l'infection par l'action d'anticorps facilitants, de l'infection persistante et/ou de la destruction directe des cellules β pancréatiques (Sane et al. 2011 ; Hober and Sané 2010) (Figure 2). Cette action directe des CVB sur le pancréas à travers l'infection suivie d'une destruction des cellules β ou à travers l'activation de processus inflammatoires a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi une étude *in vitro* a montré que les cellules β humaines sont infectables et de façon persistante par CVB4 et CVB3 et cette infection persistante est associée à une synthèse d'interféron alpha par ces mêmes cellules (Chehadeh et al. 2000). Plusieurs entérovirus peuvent ainsi infecter les cellules β avec des conséquences diverses. L'infection par les CVB se traduit par une perturbation profonde de la fonction endocrine et une mort cellulaire consécutive à une production virale lytique (Roivainen et al. 2000). L'infection d'une lignée de cellules β (INS-1) par les CVB peut également induire une surexpression de protéines inflammatoires (Nair et al. 2010). Une infection persistante avec destruction cellulaire et/ou la surexpression de protéines inflammatoires pourraient jouer un rôle important dans la perte des cellules β et la pathogenèse viro-induite du DT1.

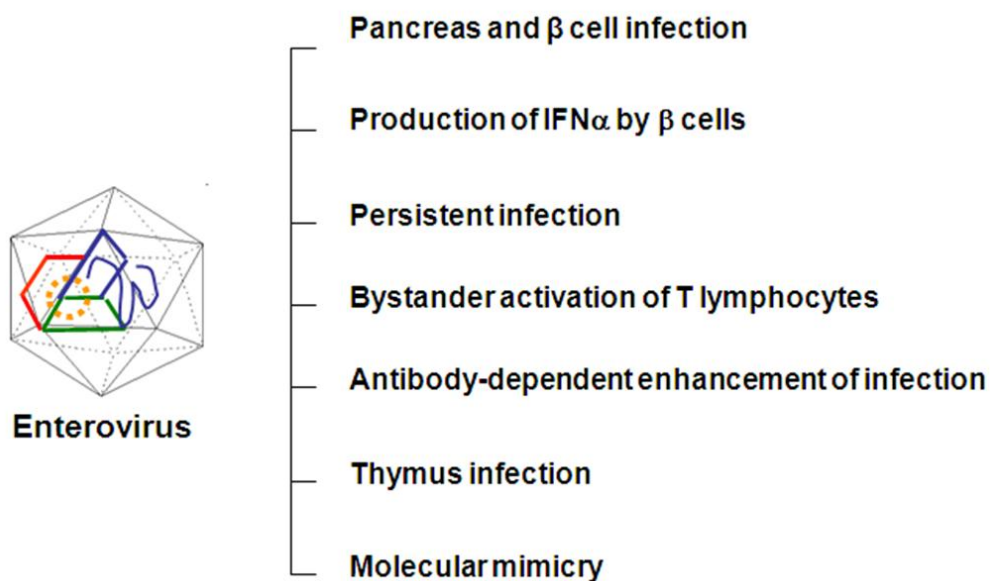


Figure 2 : Mécanismes de la pathogenèse viro-induite du DT1 (Hober and Sane 2010). Les entérovirus peuvent jouer un rôle dans le développement du DT1 à travers divers mécanismes, d'ailleurs non mutuellement exclusives.

Il est possible que l'infection initiale des tissus pancréatiques, touchant notamment les cellules de régénération survienne à l'âge adulte, ou plus jeune voir dans la période néonatale ou même pendant la vie in utéro. Le nouveau-né est exposé au risque d'infection à entérovirus transmis par la mère (Hyoty et al. 1995). Il ne peut être exclu que l'infection se produise in utéro, dans la mesure où des auteurs ont observé que la survenue d'une infection entérovirale pendant la grossesse exposait l'enfant à un risque accru de développer un diabète de type 1 (Lonrot et al. 2000 ; Otonkoski et al. 2000).

I.1.3 – Néogenèse des cellules β

Le déclenchement du DT1 suite à un déficit en insuline va dépendre étroitement de la masse de cellules β ou en tous cas de la masse de cellules β fonctionnelles à un moment donné. Le

maintien de cette masse de cellules à un niveau capable de protéger l'individu d'une évolution vers le déficit en insuline va dépendre de la capacité du tissu endocrine à se renouveler. La prolifération, la survie et la néogenèse font partie des mécanismes explorés au cours des études expérimentales.

Le tissu endocrine pancréatique humain se différencie à partir de cellules épithéliales ductales progénitrices lors de l'organogenèse embryonnaire (Teitelman et al. 1987). Cependant, des données expérimentales montrent que cette différenciation ne semble pas limitée à la période embryonnaire, mais continue, certes à des degrés moindres, tout au long de la vie du sujet (Bonner-Weir et al. 1993). Ainsi, les cellules ductales pancréatiques adultes sont considérées par de nombreux auteurs comme une source de cellules souches capables de se différencier en cellules β (Wang et al. 1995 ; Heremans et al. 2002 ; Grapin-Botton et al. 2005). Il est démontré *in vitro* chez l'homme et le rongeur et *in vivo* chez le rongeur l'existence d'un processus de renouvellement des cellules β , avec une mort cellulaire par apoptose et leur remplacement par une réplication de cellules β préexistantes ainsi que par la néogenèse de cellules endocrines à partir de la différenciation de cellules ductales progénitrices (Bonner-Weir et al. 2001). Bien que les deux processus - prolifération et néogenèse – agissent de concert pour assurer le renouvellement des cellules endocrines, il a été montré que la voie de la néogenèse semble prédominante chez l'homme, alors que la réplication prédomine chez le rongeur (Bonner-weir et al. 2004 ; Forsyth et al. 2002). Afin de faire face au besoin croissant en insuline, une augmentation de la masse de cellules β par néogenèse est observée chez des sujets obèses (Butler et al. 2003) et cette néogenèse de cellules endocrines est obtenue *in vitro* chez l'homme adulte à partir de tissu épithélial exocrine notamment les cellules ductales (Hao et al. 2006).

Les résultats de ces différentes études montrent qu'une destruction de cette source de cellules ductales progénitrices après la naissance ou, tout au moins, une altération du processus de néogenèse pourrait compromettre durablement le maintien d'un pool de cellules β indispensable à l'homéostasie glucidique.

I.3 – Facteurs naturels de prévention

I.3.1 – Infections virales et facteurs alimentaires

Les infections entérovirales sont fréquentes dans l'enfance. Les modifications de nos modes de vie, en particulier de nos habitudes alimentaires, sont autant de facteurs qui pourraient jouer un rôle important dans l'apparition et/ou l'aggravation de maladies. En particulier, plusieurs études épidémiologiques ont conclu que l'absence d'allaitement maternel est associée à un risque plus élevé de développement du DT1 (Malcova et al. 2006 ; Schack-Nielsen et al. 2005 ; Sadauskaite-Kuehne et al. 2004). Des études antérieures avaient suggérées que le lait maternel contenait des molécules naturelles capables de prémunir l'enfant contre les agents infectieux (Zaman et al. 1993 ; Seganti et al. 2004). Parmi ces composés, les anticorps neutralisants maternels, la lactoferrine, les composés lipidiques joueraient un rôle prépondérant (Isaacs et al. 1990 ; Newburg et al. 2004 ; Sadeharju et al. 2007). L'absence d'allaitement maternel est associée à un risque plus élevé d'infections entérovirales, (Sadeharju et al. 2007) mais la nature du ou des facteurs protecteurs du lait conférant cette protection n'a pas été élucidée. Cependant il n'est pas exclu que les constituants du lait maternel ci-dessous énumérés puissent jouer un rôle dans la protection qu'il apporte aux jeunes enfants vis-à-vis du DT1.

I.3.2 – Infections virales et facteurs de protection intrinsèque

Des inhibiteurs non spécifiques, à spectre antiviral limité, ont déjà été mis en évidence par certains auteurs (Thiry et al. 1978; Gerna et al. 1980). Cependant un intérêt particulier est aujourd'hui accordé à la mise en évidence et à la caractérisation d'inhibiteurs à large spectre, à même de protéger l'individu contre plusieurs agents viraux à la fois (Baron et al. 1989; Singh et al. 1995 ; Singh et al. 1999). L'existence d'inhibiteurs à large spectre est notamment explorée dans l'intestin de mammifère. Des inhibiteurs actifs vis-à-vis de virus à ADN (virus de la vaccine, virus herpétique) et de virus à ARN enveloppés ou non enveloppés (mengovirus et virus sendbis) ont notamment été mis en évidence dans l'intestin de souris (Singh et al. 2001).

Le milieu intestinal, avec sa flore commensale, subit les influences de l'alimentation, de l'environnement et des médicaments, notamment les antibiotiques. Le mode d'accouchement (voie basse ou césarienne) et l'alimentation du nouveau-né (allaitement maternel ou lait maternisé) influencent significativement la composition de la flore microbienne (Dominguez-Bello et al. 2010 ; Gronlund et al. 1999) ; avec en particulier un risque de déclenchement du DT1 plus élevé à l'adolescence chez les enfants nés par césarienne (Cardwell et al. 2008).

Le rôle de la flore intestinale dans les processus auto-immuns fait également l'objet d'une attention particulière ; et les résultats d'études épidémiologiques et expérimentales suggèrent un lien direct entre les altérations de la flore microbienne commensale intestinale et le développement de maladies auto-immunes y compris le DT1. En particulier, le régime alimentaire impacte la diversité fonctionnelle de la flore commensale en modifiant sa

composition (Muegge et al. 2011) ; ce qui suggère qu'en affectant la diversité et la fonction de la flore microbienne, le régime alimentaire pourrait affecter le développement naturel du système immunitaires. Ainsi, la diminution de l'exposition des jeunes enfants aux microorganismes aussi bien pathogènes que commensaux bouleverse le développement normal du système immunitaire, avec pour conséquences une rupture de tolérance (Okada et al. 2010) ; ce qui constitue le socle de la « Théorie de l'hygiène » envisagée pour expliquer la prévalence élevée des maladies auto-immunes dans les pays développés.

D'ailleurs des résultats d'études expérimentales chez l'animal et chez l'homme tendent à conforter cette hypothèse selon laquelle l'altération de la flore intestinale pourrait constituer l'élément clé de la pathogenèse des maladies auto-immunes y compris le DT1 (Oldstone et al. 1988 ; Verdu et al. 2000 ; Ochoa-Reparaz et al. 2009).

Envisager une politique de prévention nécessite au préalable une compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine du DT1. La compréhension de ces mécanismes fait l'objet d'études faisant appel à l'utilisation de modèles animaux développant spontanément un syndrome diabétique. En raison de leur statut génétique les prédisposant au diabète, certains modèles de souris (non-obese diabetic mouse ou NOD) et de rats (bio-breeding-diabetes-prone rat ou BBDP) sont préférentiellement utilisés pour l'étude de ces mécanismes. L'autre intérêt des modèles murins en particulier réside dans la présence du récepteur CAR des entérovirus qui permet leur infection par les CVB (Jaidane et al. 2009). L'adoption de souriceaux NOD nouveau-nés ou le transfert d'embryons de souris NOD à d'autres souches de souris non-NOD (ICR, DBA en particulier) se traduit par une diminution de l'incidence du DT1 variable en fonction de la souche choisie (Washburn L et al. 2007). Ces différentes observations suggèrent que non seulement le risque de développer un DT1 chez

la souris NOD peut être modulé par différents facteurs en pré- et post-natal, mais aussi que cette souche est un excellent modèle pour l'identification et la caractérisation de ces différents facteurs.

Le modèle murin présente cependant, comme d'ailleurs tous les modèles animaux d'étude des pathologies humaines, un certain nombre de limites dont celle liée à sa petite taille, avec quelques difficultés pour la manipulation des organes (Jaidane et al. 2009). Cette limitation pourrait être surmontée en utilisant d'autres modèles un peu plus gros tel que le rat. D'ailleurs le rat BBDP, dérivé de croisements entre rats Wistar, est le premier modèle animal de DT1 spontané, avec des taux de pénétrance du diabète plus élevés que dans le cas de la souris NOD (Nakhoda et al. 1977). L'infection de lignées pancréatique (RINm5F) de rat par CVB4E2 a déjà été obtenue *in vitro* (Berg et al. 2005). Cette souche de rat BBDP semble particulièrement intéressante pour l'étude de l'influence des facteurs environnementaux, en particulier les virus, dans la pathogenèse du DT1 (Bortel and Yang 2012). Une infection par CVB4 de rat *in vivo* a précédemment été documentée chez une autre souche, la LEW.1WR1, sans induction de la maladie, cette dernière n'étant obtenue, et à de faible taux d'ailleurs, qu'après stimulation préalable de l'immunité innée de l'animal (Tirabassi et al. 2010). Une étude de l'infection des rat BBDP revêt donc un intérêt certain dans l'exploration de modèles plus adaptés pour l'étude de cette pathologie.

I.4 – Objectifs des travaux

Le DT1 est une maladie chronique multifactorielle dont la pathogenèse associe aussi bien des facteurs génétiques, immunologiques qu'environnementaux (Figure 3). Les infections à

CVB, notamment à CVB4, transmises par voie digestive, constituent le facteur de risque environnemental le plus souvent évoqué et analysé dans la littérature spécialisée. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer cette association entre CVB4 et DT1. Cependant d'autres approches étiologiques méritent d'être envisagées et explorées, notamment depuis que des travaux ont suggéré que chez des souris infectées par la souche diabétogénique CVB4E2, la disparition des cellules β était en fait due à un défaut de régénération plutôt qu'à une destruction directe de ces cellules par le virus (Yap et al. 2003). Un tel mécanisme pourrait-il être impliqué chez l'homme dans le développement du DT1 induit par les CVB ? Pour apporter des éléments de réponse à cette question, nous avons étudié l'infection par CVB4E2 de cellules ductales humaines considérées comme la source principale de cellules souches impliquées dans la néogenèse des cellules endocrines du pancréas. Par ailleurs nous avons exploré la susceptibilité à l'infection à CVB4 du tissu pancréatique à différents âges de la vie dans un modèle animal.

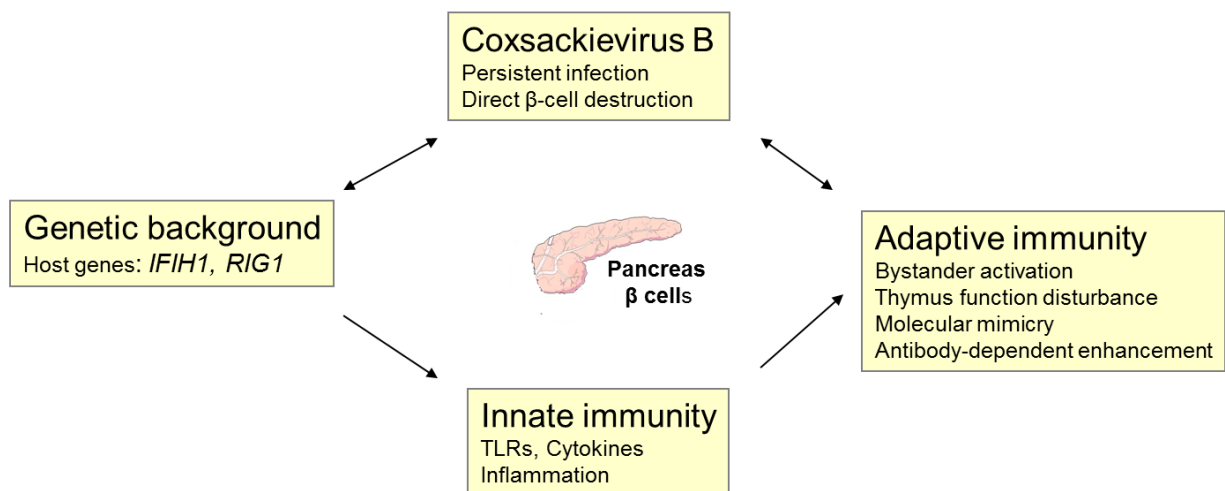


Figure 3 : Interactions entre les facteurs génétiques, le système immunitaire et les CVB
(Sane et al. 2011)

La prévention des infections virales demeure le meilleur moyen de protéger les individus contre les maladies qu'elles provoquent. Si de plus ces infections jouent un rôle causal ou aggravant dans une maladie tel que le diabète de type 1, il est important de mieux connaître les moyens de s'en prémunir. L'isolement des facteurs protecteurs intrinsèques naturels présents dans des milieux biologiques, de même que l'identification de bactéries potentiellement protectrices, permettront de développer de nouvelles approches préventives : nouvelle génération de lait infantile et/ou complément alimentaire à visée pédiatrique.

Nous avons abordé la problématique de la prévention selon deux axes. Nous avons mis en évidence l'activité anti-entérovirus (modèle CVB4) du milieu intestinal murin. Nous avons également étudié l'activité du lait humain in vitro vis-à-vis de CVB4, puisque ce virus qui infecte volontiers les jeunes enfants est susceptible de jouer un rôle dans le DT1. Par ailleurs l'effet du lait humain sur l'incidence du DT1 chez la souris NOD et sur la flore commensale intestinale de ces animaux a été exploré.

II – MATERIEL ET METHODE

II.1 - Infection à CVB4E2 de cellules ductales humaines et perturbation de la formation de structures ressemblant à des ilots

II.1.1 - Cellules

La ligne pancréatique humaine d'origine ductale PANC-1 était entretenue dans du milieu de culture DMEM 4,5 g/L de glucose (Invitrogen, France), supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF), 100 U de pénicilline et 100 µg de streptomycine par mL (Invitrogen, France).

Les cellules ductales humaines sont isolées de la fraction exocrine enrichies. Les organes sont prélevés auprès de donneurs adultes, en accord avec la loi Française et les recommandations du Comité d'Ethique de notre institution. Les pancréas sont dissociés avec une collagénase (Liberase; Roche Diagnostics, Meylan France) selon la technique automatisée de Ricordi (Ricordi et al. 1989). Après purification à l'aide d'un séparateur de cellules dans un gradient continu d'Euroficoll (Cobe 2991; Cobe BCT, Lakewood, CO), la fraction exocrine est récupérée, lavée dans une solution de Hanks, puis mise en culture dans un milieu DMEM 3 g/L de glucose supplémenté de 10% de SVF, 1% d'insuline transferrine sélénium (ITS, Sigma Aldrich) et de 50 µg/mL de Généticine (G418, Sigma Aldrich) afin de limiter la croissance de fibroblastes, comme indiqué par Vila *et al.* (Vila et al. 1994). Le milieu de culture est renouvelé au bout des 12 premières heures de culture, puis tous les 3 jours. Au bout de 8 jours, les cellules exocrines sont détachées à l'aide trypsine-EDTA et ensemencées dans des flacons contenant du DMEM supplémenté de 10% de SVF, de

pénicilline (100U/mL) – streptomycine (100 µg/mL) et de fungizone (0,25 µg/mL) (Invitrogen, France). Comme cela a été précédemment montré, ces cellules pancréatiques exocrines sont majoritairement constituées de cellules ductales au bout de 8 jours de culture, avec des taux supérieurs à 80% entre J6 et J9 après isolement et mise en culture (Fanjul et al. 2010 ; Gmyr et al. 2000). L'évaluation de la prolifération et de la viabilité cellulaire est effectuée à l'aide de Bleu Trypan (Sigma Aldrich) et d'Uptiblue (Uptima Interchim, France) selon les procédures habituellement utilisées.

II.1.2 - Virus

La souche diabétogénique CVB4E2 utilisée dans ce travail nous a été initialement fournie par Ji-Won Yoon (Julia McFarlane Diabetes Research Center, Calgary, Alberta, Canada). Elle est cultivée sur cellules Hep-2 (BioWhittaker, Verviers, Belgium) dans du milieu MEM supplémenté de 10% de SVF et de 1% de L-glutamine (Invitrogen, France). Après 72h de culture suivies de 3 séries de congélation-décongélation à -80°C, les surnageants de culture sont aliquotés après une centrifugation à 4°C de 10 mn à 2000g. Les titres viraux sont déterminés sur cellules Hep-2 selon la méthode de dilution en point final de Reed-Muench les résultats sont exprimés en TCID50/ml et des aliquotes sont conservés à -80°C.

II.1.3 - Infection des cellules

Les cellules ductales primaires ainsi que les cellules PANC-1 sont mises en culture à raison de $1,25 \cdot 10^5$ cellules par puits dans des plaques 24 puits 24h avant d'être infectées par 250 uL/puits d'une suspension virale de CVB4E2 titrée à $2,1 \cdot 10^3$ TCID50/mL. Au bout de 24h de culture suivant l'inoculation, les cellules sont lavées 5 fois avec du DMEM froid avant d'être remises en culture dans du milieu DMEM complet à l'étuve à 37°C sous 5% de CO₂. Les

cultures infectées et contrôles sont suivies pendant 15 jours – pour les cellules ductales primaires – et au-delà de 37 semaines pour les cellules PANC-1, avec renouvellement du milieu de culture tous les 3 jours. Les surnageants de culture sont à chaque changement de milieu récupérés et conservés à -80°C pour l'étude de l'infection. Le suivi de l'infection a consisté en une évaluation microscopique de la morphologie et de la viabilité des cellules, ainsi qu'en la recherche de marqueurs d'infection : la protéine de capsid VP1 et l'ARN viral.

II.1.4 - Formation de structures ressemblant à des îlots (ICAs)

Les cellules PANC-1 sont mises en culture à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules/puits dans des plaques de 6 puits contenant du milieu de culture avec SVF (SCM). Pour la formation d'ICAs, les cellules, débarrassées du milieu SCM, sont traitées par de la trypsine à 0,05% pendant 120 secondes à 25°C afin de fragiliser les cellules sans les détacher de leur matrice extracellulaire. Les cellules sont ensuite mises en culture dans un milieu sans SVF (SFM), comme décrit par Hardikar et al. (Hardikar et al. 2003). Le SFM était du milieu DMEM/F12 supplémenté de 1% de BSA (Sigma Aldrich) et de 1% d'ITS (Sigma Aldrich).

II.1.5 - Extraction d'ARN et RT-PCR

L'extraction de l'ARN cellulaire s'est faite à l'aide du coffret RNeasy Total RNA Isolation System (Qiagen). Le coffret Quant-it RNA Assay (Invitrogen) est utilisé pour le dosage de l'ARN total en plaque 96 puits avec l'appareil Mx3000P (Stratagen). Les RT-PCR sont réalisées avec le thermocycleur Perkin-Elmer-Applied Biosystems GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Le coffret Superscript™ One-step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen) est utilisé pour la réalisation des réactions de RT-PCR. Ce coffret permet la synthèse d'ADNc et son amplification en une seule étape. La transcription inverse est directement suivie par

l'étape d'amplification. Le mélange réactionnel, volume de 50 μ L, subit une étape préalable de transcription inverse de 30 mn à 50°C, suivie d'une étape de dénaturation de 5 mn à 94°C. L'étape d'amplification est réalisée en 35 cycles caractérisés par une dénaturation de 30s à 94°C, une hybridation de 30s à une température X variable en fonction de la molécule recherchée et une extension de 1 mn à 72°C. L'extension finale a duré 7 mn à 72°C. La température X est de 52°C pour la GAPDH, 56°C pour la CK19, 55°C pour la MxA, 52°C pour CVB4E2, 53°C pour Pdx-1 et 55°C pour l'IGF2. Les produits PCR sont révélés sur un gel d'agarose « DNA grade » (Type 5, Euromedex). Les séquences des amorces utilisées dans les différentes réactions de RT-PCR sont pour l'amorce sens CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG et pour l'anti-sens ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA.

II.1.6 - RT-PCR sans extraction

La détection d'ARNm et d'ARN viral dans un nombre limité de cellules ($N < 20$ cellules) par RT-PCR sans extraction préalable est réalisée comme précédemment décrit, mais avec quelques modifications (Huang et al. 2009 ; Surmeier et al. 1996 ; Wang et al. 2006). Brièvement, les cultures de cellules PANC-1 ainsi que les contrôles sont lavées 8 fois avec du PBS froid. Le surnageant du dernier lavage est conservé congelé à -80°C pour la recherche d'ARN viral par RT-PCR selon la procédure ci-dessous décrite. Après un traitement de 5 mn à la trypsine-EDTA, les cellules sont recueillies dans un tube de 15 mL à raison de 2 mL de DMEM complet par puits. Au bout de 5 mn de centrifugation à 400g et 4°C, les cellules sont reprises dans 1 mL de PBS. La suspension cellulaire est ensuite comptée sur lame de Malassez au bleu Trypan puis diluée pour obtenir approximativement 10^5 cellules/mL. Les échantillons sont ensuite dilués de façon sériée dans du PBS sur une plaque 96 puits de façon à obtenir approximativement 1 à 10 cellules dans la dernière dilution. Les plaques sont

centrifugées à 1600g pendant 10 mn, portées à 65°C pendant 20 mn et immédiatement mises à congeler à -80°C. Afin d'éviter la dégradation enzymatique des ARN, la RNase Inhibitor (Roche Diagnostics, France) est rajouté au milieu immédiatement après décongélation et les échantillons sont directement utilisés pour la RT-PCR sans extraction préalable. La synthèse d'ADNc et l'amplification sont réalisées dans un microtube en utilisant le coffret SuperScript™ One-Step RT-PCR with PlatinumR Taq (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. La réaction est réalisée dans un volume total de 50 µL comportant 25 µL de 2X Buffer Reaction Mix, 1 µM de chaque amorce (EV1 and EV2), 2.5U de la rétrotranscriptase /Platinum Taq polymerase Mix. Des amorces de GAPDH sont aussi introduites dans le mélange réactionnel afin de s'assurer de la présence de cellules dans chaque échantillon. Les échantillons sont soumis à une première étape de rétrotranscription de 30 mn à 50°C, suivie d'une dénaturation de 5 mn à 94°C et de 35 cycles caractérisés par une dénaturation de 30s à 94°C, une hybridation de 30s à 52°C, une élongation de 1 mn à 72°C et par une extension finale de 7 mn à 72°C. Les produits de la RT-PCR sont directement utilisés pour la réalisation d'une PCR semi-nichée, avec le coffret JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase Mix (Sigma Aldrich) et selon les instructions du fabricant. La réaction est réalisée dans un volume final de 50 µL composé de 5 µL de l'amplifiat de la RT-PCR, 1 µM de chacune des amorces (EV1 et EV3), 1 U de JumpStart Accu Taq LA DNA polymerase, 0.2 mM pour chaque dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, 15 mM ammonium sulfate (pH 9.3) et 1% de Tween 20. Les échantillons sont soumis à 3 mn de dénaturation à 94°C, suivies de 35 cycles caractérisés par une dénaturation de 30s à 94°C, une hybridation de 30s à 52°C, une élongation de 1 mn à 72°C et par une extension finale de 7 mn à 72°C.

II.1.7 - Immunofluorescence

Après lavage avec du PBS 1X, les cellules sont fixées au paraformaldehyde frais à 4% et perméabilisées avec le mélange méthanol/acétone froid. Le blocage des sites de fixation non spécifiques est réalisé respectivement avec le mélange sérum de rat / solution anti-Fc receptor (Miltenyibiotec™) et avec une solution avidine-biotine (Vector™). Les cellules sont dans un premier temps marquées avec les anticorps primaire : le mouse anti-Enterovirus VP1 antibody (clone 5D8/1) ou le mouse anti-CK19 antibody (clone BA17) (Dako). Après lavage, les cellules sont ensuite traitées avec les anticorps secondaires, goat anti-mouse TRITC antibody (Sigma) en ce qui concerne la VP1, et le rabbit anti-mouse Alexa Fluor 488 (Molecular ProbesR) pour le CK19. Les noyaux cellulaires sont révélés par une solution de Hoesch dye (Sigma). Les marqueurs fluorescents sont visualisés à l'aide d'un microscope confocale, le Zeiss LSM 710 confocal laser-scanning microscope équipé d'un faisceau laser à base d'argon et d'hélium.

II.1.8 - Analyses statistiques

L'analyse des données a nécessité l'utilisation de programmes statistiques. Nous avons utilisé le logiciel de traitement de données Graphpad pour l'élaboration des graphes. Les P-values ont été calculées avec le programme de comparaison de données qui utilise le test de Mann et Whitney. La P-value nous permet d'affirmer qu'il existe une différence significative entre deux moyennes. Dans ce cas, sa valeur doit être inférieure à 0,05.

II.2 – Coxsackievirus B4 peut infecter in vitro des fragments de pancréas de rat à différents âges de la vie

II.2.1 - Rats

Les rats Wistar mâles utilisés dans ce travail sont fournis par Charles Rivers Laboratoires (L'Abresle, France). Ces rats sont maintenus à l'abri de contaminants spécifiques et ont reçu une alimentation standard, code D04 (SAFE, Augy, France). Cette alimentation renferme une énergie digestible totale de 2.9 Kcal /g, avec 16% de protéines, 3% de graisses et 60% d'hydrates de carbone. Les animaux sont soumis à un cycle d'éclairage (12 heures de lumière de 7h à 19h) et sous air climatisé (température 22°C). Ils n'ont pas subi de traitement particulier. Cette étude a fait appel à des animaux d'âges différents, allant des fœtus de 21 jours de gestation à des adultes âgés de 8 mois.

II.2.2 - Cellules HEp-2

Les cellules Hep-2 sont isolées à partir d'un carcinome du larynx. C'est la lignée cellulaire de référence pour la culture des Entérovirus. Elle est fournie par Biowhittaker (Verviers, Belgique). La culture s'effectue dans du milieu MEM 1X (Gibco, Invitogene) supplémenté de 10% de SVF décomplémenté (Gibco-BRL, Eragny, France), 1% de L-glutamate, 1% d'une solution d'acides aminés non essentiels 100x (Gibco-BRL, Eragny, France), 1% de pénicilline-streptomycine (Biowhittaker, Belgique), et 0.05% de funzizone (Amphotéricine B, SQUIBB, Princeton, USA). L'incubation se fait à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% de CO₂ dans des flacons de culture de 25 cm² vissés (Becton Dickinson, France).

II.2.3 - Prélèvement du pancréas

Les rats sont préparés suivant les règles de stérilité usuelles destinées au prélèvement d'organes ou de tissus en vue d'une culture *ex vivo*. Après une anesthésie générale au pentobarbital sodique, l'abdomen de l'animal est dénudé à l'aide d'une tondeuse électrique, puis décontaminé avec une solution polyvidone iodée (Bétadine® 10% ; MADA Pharma, Mérignac, France). Dès la réalisation d'une large laparotomie, l'état du pancréas est évalué. Afin de faciliter le prélèvement du pancréas, un large décollement du bloc duodéno pancréatique est réalisé. Cet ensemble est disséqué dans une boîte de Pétri contenant une solution de PBS (Gibco-BRL, Eragny, France) glacée. Le pancréas ainsi disséqué est conservé dans une solution de PBS glacée avant sa mise en culture en entier ou découpé en plusieurs fragments, selon le volume de l'organe, et donc selon l'âge de l'animal, avec 5, 4, 3, 2 et 1 fragments pour respectivement le rats de 8 mois, 40 jours, 21 jours, 7 jours et des embryons de 21 jours de gestation.

II.2.4 - Culture organotypique

Les fragments de pancréas sont mis en culture dans des plaques 24 puits Multiwell® (Becton Dickinson, France) en présence d'inserts Milicell® (Millipore, Carrigtwohill, Ireland). Le milieu de culture est à base de DMEM 4,5 g/L de glucose (Gibco, Invitogene) contenant 10% de DMSO, 1% d'ITS, 10% de SVF, 1% de L-glutamine, 1% de pénicilline-streptomycine et 1% d'acides aminés non essentiels (Sigma-Aldrich®, France). Les cultures organotypiques sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours.

II.2.5 - Viabilité tissulaire

La viabilité tissulaire des cultures organotypiques est évaluée au moyen du test Uptiblue, qui consiste à mesurer l'activité mitochondriale des cellules. Le réactif Uptiblue (réazurine,

commercialisé sous la marque ALAMAR BLUE) est un indicateur coloré d'oxydoréduction. La réazurine (bleue et non fluorescente) est réduite en résorufine (rose et fluorescente) par les cellules vivantes. Expérimentalement, l'Uptiblué est dilué au 1/4 dans le milieu de culture. Après une incubation de 4 heures à 37°C, la fluorescence de 500 µL de surnageant est évaluée aux longueurs d'onde 570 nm et 600 nm à l'aide du spectrophotomètre DU®-64 (Beckman).

II.2.6 - Infection des fragments d'organes

Après dissection, les fragments de pancréas sont d'abord mis en culture pendant une heure dans les conditions précitées. Les cultures sont inoculées 100 µL d'une suspension virale contenant CVB4E2 titré à $1,44.10^7$ TCID50/mL puis elles sont replacées dans l'incubateur. Au bout de 24h, les surnageants de culture sont aliquotés, puis congelés à -80°C. Les fragments d'organe sont lavés plusieurs fois avec du DMEM froid afin de les débarrasser des particules virales résiduelles ; ils sont ensuite remis en culture dans des plaques contenant des inserts. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours et à chaque fois, un fragment d'organe et les surnageants sont congelés à -80°C pour l'étude de l'infection.

II.2.7 - Analyse des surnageants de culture

Les surnageants ont été analysés en utilisant deux méthodes : la technique des TCID50 pour le titrage de virus (voir II.1.2) et la PCR en temps réel.

II.2.8 - Extraction et dosage de l'ARN des organes

La méthode d'extraction utilisée est celle au Tri-Reagent (Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France). 5 mg de tissu pancréatique sont broyés dans 900 µL de Tri-Reagent à l'aide

de pistons (VWR, France). Le broyat est laissé à température ambiante pendant 5 min, puis centrifugé à 12 000g pendant 10 mn à +4°C. Le surnageant est repris avec 200 µL de chloroforme qui permet la séparation des protéines associées aux acides nucléiques. Le mélange, homogénéisé au vortex, puis incubé 15 mn à température ambiante, est centrifugé à 12000g pendant 15 mn à +4°C. La phase aqueuse, qui renferme l'ARN, est reprise dans 500 µL d'isopropanol afin de précipiter l'ARN. Après homogénéisation et incubation pendant une nuit à -20°C, le mélange est centrifugé à 12000g pendant 10 mn à +4°C. Le culot, lavé 2 fois à l'éthanol 75% fraîchement dilué, puis séché 5 mn sous la hotte, est repris dans 50 µL d'eau dépourvue de nucléases.

Concernant l'extraction de l'ARN des surnageants de culture, 100 µL d'échantillon sont repris dans 900 µL de Tri-Reagent. La suite de la procédure d'extraction est la même que celle appliquée aux organes précédemment broyés au piston.

Le dosage de l'ARN total est réalisé à l'aide de la trousse Quant-iT® RNA Assay (Molecular Probes®, Invitrogen) et la lecture de la fluorescence se fait grâce à l'automate Mx3000P® (Stratagene®). 10 µL d'une gamme allant de 0 ng/µL à 10 ng/µL et 10 µL d'extrait d'ARN sont ajoutés aux 200 µL de la solution de travail (Quant-iT dilué au 1/200e) contenue dans une plaque 96 puits.

II.2.9 - RT-PCR

Nous avons appliqué deux types de techniques de RT-PCR : une RT-PCR semi quantitative et une RT-PCR en temps réel. La procédure de la méthode semi-quantitative est celle présentée au paragraphe II.1.

Dans le cas de la RT-PCR en temps réel, nous avons utilisé le coffret AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene®) pour la rétrotranscription de l'ARN de CVB4 en ADNc. L'amorce anti-sens ou l'amorce sens (EV1 ou EV2) est utilisée à 10 µM comme matrice. La réaction est réalisée pour environ 0,3 pg à 3 µg d'ARN extrait dans un volume final de 20 µL contenant 10 µL de Master Mix 2x, 0,3 µg d'oligo (dT) et de 20 U d'*AffinityScript revers transcriptase*. La réaction de rétrotranscription est alors effectuée avec une première incubation à 25°C pendant 5 mn pour l'hybridation des amorces, suivie de la synthèse de l'ADNc à 42°C pendant 15 mn et de 5 mn d'élongation finale à 95°C. La PCR est ensuite réalisée avec le coffret Brilliant® II QPCR Master Mix (Stratagene®), avec sa sonde spécifique aux entérovirus, dans un volume final de 25 µL contenant le Mix Sybr Green® 2x, 2.5 µM pour chacune des amorces sens et anti-sens et l'ADNc précédemment amplifié. Le mélange réactionnel est soumis à une première étape de 10 mn à 95°C de dénaturation et d'activation de la polymérase, suivie de 40 cycles consistant chacun en 30 s à 95°C de dénaturation, 1 mn à 55°C d'hybridation et 1 mn d'élongation finale à 72°C. De l'ARN extrait à partir de cellules Hep2 infectées par CVB4 E2 est rétrotranscrit et amplifié de la même manière, servant de contrôle positif dans la RT-PCR en deux étapes pour la détection des brins positifs et négatifs d'ARN de CVB4. Un contrôle négatif (sans ARN) est également inclus dans chaque réaction. Toutes les réactions sont réalisées dans le thermocycleur Mx3000P® (Stratagene®).

II.2.10 - Immunohistochimie (IHC)

Les pancréas de rats sont fixés pendant 24 heures dans un tampon PBS contenant 4% de paraformaldehyde, puis cryoprotégés suite à une autre incubation de 24 heures dans un bain de PBS à 0,05M contenant 20% de sucrose. Les blocs de pancréas ont fait l'objet de

coupes avec des sections de 12µm apposées sur des lames Superfrost® qui sont directement conservées à -80°C. L'immuno-marquage des coupes de pancréas est réalisée selon la méthode « antigen-retrieval » (Shi et al. 1997 ; Bopegamage et al.2003). Les lames de coupes, immergées dans un tampon citrate à 10mM (pH6.0), sont chauffées 3x2 minutes au four à micro-ondes. Les coupes sont ensuite refroidies puis immergées dans un bain d'H₂O₂ à 0,03% durant 30 minutes afin d'inhiber l'activité peroxydasique endogène. Pour le blocage des sites antigéniques non spécifiques, les blocs sont incubés pendant 30 minutes dans un tampon TBST (Tris Buffered Saline) à 0,05% de Tween 20 contenant 2% de sérum d'âne à température ambiante. Les échantillons sont par la suite incubés avec l'anticorps monoclonal anti-VP1 (clone 5-D8/1, Dako Cytomatio, Glostrup, Danmark) dilué au 1/100 dans du tampon TBST pendant 30 minutes à température ambiante. Un anticorps secondaire (goat anti-mouse) conjugué au peroxide-labelled dextran polymer (Dako Envision+System-HRP) et à l'AEC+ substrate chromogen (3-amino-9-ethylcarbazole) est utilisé pour la visualisation de la réaction. Les contrôles positifs et négatifs sont générés en n'ajoutant pas d'anticorps primaire et/ou secondaire. Les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline puis montées avec une lamelle dans un milieu aqueux de montage permanent avant leur lecture au microscope.

II.3 – Le lait humain peut neutraliser coxsackievirus B4 in vitro

II.3.1 - Lait maternel et sérum

Les échantillons de lait proviennent du Lactarium Régional de Lille (Hôpital Jeanne de Flandre - CHRU de Lille, France). Ces échantillons sont obtenus de 49 donneuses ayant récemment accouché. L'étude a été réalisée en respectant les règles du comité d'éthique local et les consentements éclairés de chaque donneuse ont été recueillis. Les échantillons de lait sont composés de colostrum (lait collecté entre J1 et J5 après accouchement), de lait de transition (J6 – J14) et de lait mature (à partir de J15). Chaque donneuse a fourni du lait qui a été pasteurisé ou non. Un aliquote de chaque échantillon est traité aussitôt après réception et un autre congelé à -20°C. Les fractions aqueuses et lipidiques des aliquots congelés et non congelés sont obtenues après centrifugation pendant 1h à 10000g, +4°C. La fraction lipidique est prélevée la première, suivie de la fraction aqueuse. Le lait entier, ainsi que ses différentes fractions sont dilués dans du MEM pour les tests. Un échantillon de sérum est collecté chez chaque donneuse de Lille et conservé congelé à -20°C. Des échantillons de lait sont aussi collectés chez 15 donneuses à l'hôpital Général de Loandjili (Pointe-Noire, Congo) et conservés congelés à -20°C

II.3.2 - Lait maternisé et lait de vache

Le lait maternisé utilisé dans ce travail est du lait en poudre Calisma[®], Gallia[®] (Gallia, Villefranche/Saône, France), Blédilait[®] (Blédina, Villefranche/Saône, France), Guigoz[®] (Guigoz, Marne-la-Vallée, France). Il s'agit de lait destiné à l'allaitement substitutif des bébés nourris au biberon. Les échantillons sont préparés en accord avec les recommandations de la préparation du biberon, à savoir une dosette remplie à ras-bord de lait en poudre à

dissoudre dans 30 mL d'eau stérile. Le lait frais de vache provient d'une ferme des environs de Lille. Le lait maternisé reconstitué et le lait frais de vache sont centrifugés dans les mêmes conditions que le lait maternel afin de séparer les fractions aqueuses et lipidiques.

II.3.3 - Test d'activité antivirale

L'activité antivirale du lait et du sérum est évaluée avec une méthode modifiée de séroneutralisation. Des dilutions successives de 50 µL de chaque échantillon dans 50 µL du milieu de culture MEM sont réalisées dans une plaque de microtitration de 96 puits. 25 µL d'une suspension virale titrée à 25 TCID₅₀ ajoutés à chaque puits. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 2h à l'étuve à 37°C, 5% CO₂. Après cette première incubation, 100 µL de milieu MEM contenant 1.10⁵ cellules sont mis dans chaque puits et les plaques remises à l'incubateur. Quarante-huit heures plus tard, les cellules sont observées au microscope inversé (Olympus CKX41) à l'objectif x10. Le titre d'activité antivirale est représenté par l'inverse de la dilution à partir de laquelle une inhibition de l'effet cytopathique (ECP) est observée.

II.3.4 – Appauvrissement en immunoglobulines A

La jacaline est une lectine extraite des graines de fruit d'*Artocarpus integrifolia*. C'est une glycoprotéine dépourvue d'activité enzymatique et non synthétisée par un système immunitaire. La jacaline lie spécifiquement les immunoglobulines A sériques et sécrétoires humaines (Roque-Barreira et al. 1985). La lectine est fixée à des billes d'agarose dans une suspension saline à 1 M NaCl contenant 0.01% de thiomersale (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), un composé organomercurique relativement cytotoxique pour la lignée cellulaire Hep-2. Afin d'éviter cette cytotoxicité, 1 volume de billes de lectine est mélangé à 2

volumes de PBS, le mélange est vortexé puis centrifugé à 1000g pendant 15 minutes à 4°C. L'opération est répétée deux fois de suite, en se débarrassant à chaque fois du surnageant. Les billes de lectine sont, à la fin des lavages, remises en suspension dans du tampon PBS et prêtes à l'emploi.

Pour la caractérisation du support de l'activité antivirale du lait maternel, 300 µL d'une suspension de billes de lectine dans du PBS sont mélangés volume à volume avec la fraction aqueuse du lait, puis vortexée pendant une minute ; le mélange est mis à incuber, sous agitation constante, pendant 24 heures à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé à 1000g pendant 30 mn à 4°C. Le surnageant est prélevé pour déterminer l'activité anti-CVB4 selon la procédure précédemment décrite (voir II.3.3).

II.3.7 - Analyses statistiques

L'analyse statistique des résultats obtenus est réalisée avec les tests de Wilcoxon ou de Mann-Whitney quand ils sont justifiés. Les différences sont considérées statistiquement significatives si $P < 0,05$. Les corrélations sont évaluées avec le test de Spearman.

II.4 – Effet du lait humain sur l'incidence du diabète de type 1 et sur la flore commensale intestinale chez la souris NOD

II.4.1 – Animaux et protocole

Toutes les expériences sont approuvées par le comité d'éthique local pour l'expérimentation animale. Les souris femelles NOD/LTJ (Charles Rivers Laboratories, France), au nombre de 16 par essai et âgées de 4 semaines, sont maintenues en cage. Toutes les souris ont un accès libre à l'alimentation (granulés stérile) (UAR, Epiney-sur-Orge, France). L'eau stérile et le lait maternel écrémé sont donnés aux animaux tous les jours en fin de journée selon les groupes (8 souris par groupe), à raison de 40 mL par cage de 4 souris. Tous les matins les volumes de boisson restants sont relevés. Deux essais sont réalisés successivement.

II.4.2 – Lait maternel écrémé et eau stérile

Les échantillons de lait maternel sont fournis par le Lactatium Régional de Lille (Dr N. Kacet – Hôpital Jeanne de Flandre - CHRU de Lille, France). Le lait maternel est obtenu de donneuses entre J1 et J10 post partum. Des consentements éclairés sont obtenus de chaque donneuse. Les échantillons sont poolés en fonction du jour de collecte avant d'être centrifugés pendant 1h à 10000g, +4°C (Jouan KR422). La fraction lipidique est délicatement enlevée et la fraction aqueuse écrémée est filtrée sur papier Whatman stérile (GR1 30MM, GE Healthcare Whatman). L'eau stérile et la fraction aqueuse de lait maternel écrémé sont conservées congelés à -20°C.

II.4.3 – Surveillance de la glycémie

Les souris sont pesées une fois par semaine. Le dosage de la glycémie est effectué une fois par semaine à l'aide du lecteur de glycémie Contour TS (Bayer HealthCare) à partir d'une goutte de sang prélevée à la queue de l'animal. Les souris sont considérées comme diabétiques après deux mesures successives de la glycémie égales ou supérieures à 14 mmol/L. La glycosurie est parallèlement mesurée à l'aide de bandelettes réactives (Multistix™, Siemens Healthcare Diagnostics). La glycosurie est considérée comme positive lorsque un taux de glucose équivalent à 3+ est retrouvé à la lecture de la bandelette (estimé à 55 mmol de glucose/L d'urine). Les souris sont considérées comme diabétiques lorsque deux lectures successives retrouvent un taux de glucose équivalent à 3+.

II.4.4 – Dénombrement bactérien

Les selles des souris sont collectées une fois par semaine pour l'énumération bactérienne. Les animaux encore vivants sont euthanasiés par inhalation d'halothane pour le prélèvement d'organes. Les organes sont prélevés sous condition stériles selon l'ordre ci-après afin d'éviter toute contamination bactérienne : d'abord le sang intracardiaque, les poumons, le foie, la rate, les reins, les plaques de Peyer, la portion distale de l'intestin grêle, le coecum et en dernier lieu le colon.

Les échantillons de selles et d'organes sont broyés puis homogénéisés dans une solution de Ringer préalablement traité avec de la cystéine-HCl, avant d'être dilués en série. Des dilutions appropriées de selles, d'intestin, de coecum et de colon sontensemencées dans un milieu EMB (BBL), Slanetz (BBL), MRS (BBL), Beerens (BD, France), gélose Columbia (BBL) avec gentamycine (40 mg/mL) pour l'énumération respectivement des entérobactéries, entérocoques, lactobacilles, bifidobactéries et des bactéries anaérobies. Le dénombrement

des spores de clostridium est effectuée sur gélose Columbia agar base (BBL, France) supplémentée de glucose (0,5%) et de cystéine-HCl (0,03%) ensemencée avec la dilution du broyat intestinal chauffée à 70°C pendant 10 min. Les dilutions appropriées de rein, de rate, de foie, de poumon, de plaques de Peyer sont ensemencées sur une gélose au sang de cheval (Columbia agar base, BBL, France) supplémentée de glucose (0,5%) et de cystéine-HCl (0,03%). Les boîtes ensemencées sont incubées dans une chambre anaérobie et l'énumération bactérienne est effectuée 5 jours après la mise en culture.

II.4.5 - Identification des bactéries anaérobies

Une amplification ADN suivie d'un séquençage (Genoscreen, France) a permis l'identification des bactéries anaérobies. Cette identification de micro-organisme se fait à partir d'ADN extrait ou de souches pures thermiquement inactivées (100 à 400 ng de produit PCR ou 2 µg de souches pures inactivées dilués dans 10 µL minimum d'eau). Une amplification de régions hypervariables de l'ADNr -16S est réalisée, suivie d'une purification et d'un séquençage double sens des produits PCR par la technologie Sanger (3730XL®, Applied Biosystems®).

II.4.6 – Analyses statistiques

Les tests statistiques non paramétriques sont appliqués à l'analyse des données. Les variations au niveau du dénombrement des bactéries fécales sont analysées en fonction du temps d'exposition, du moment du déclenchement du diabète, de la consommation de l'ait maternel écrémé en utilisant le *mixed model* pour les mesures répétées (Xlstat). La comparaison du dénombrement bactérien dans les différents organes est réalisée avec le test de Mann-Whitney (Xlstat).

II.5 – L'extrait intestinal murin peut neutraliser coxsackievirus B4 in vitro

II.5.1 - Souris

Les échantillons d'extrait intestinal ont été obtenus à partir d'intestin de souris non consanguines Hsd : ICR (CD-1) mâles de 10 – 12 semaines d'âge, référencées comme des souris Swiss albinos. Cette souche nous est fournie par les Laboratoires Harlan France.

II.5.2 - Obtention de l'extrait intestinal et du sérum de souris

Les intestins de souris sont d'abord lavés avec du PBS (Gibco-BRL, Eragny, France), puis émincés dans un volume de PBS de deux fois leur poids. Le broyat est vortexé pendant 1 minute, puis incubé pendant 24 heures à 4°C. Il est à nouveau vortexé 1 minute et centrifugé 400g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est à son tour centrifugé à 20000g pendant 20 minutes à 4°C, puis filtré sur des filtres Millex® de 0.45, puis de 0.22 µm (Millipore, Carrigtwohill, Irlande). Le filtrat (extrait intestinal) est aliquoté et congelé à -20°C pour le test.

Le sang des animaux est obtenu par prélèvement intracardiaque à l'aide d'une seringue après dissection et ouverture de la cage thoracique. Le sérum est obtenu après centrifugation du sang de souris à 1500g pendant 15 mn.

II.5.3 - Détermination de l'activité antivirale de l'extrait intestinal murin

L'activité antivirale de l'extrait intestinal de souris est évaluée avec une méthode modifiée de séroneutralisation. Des dilutions successives de 50 µL de chaque échantillon dans 50 µL du milieu de culture MEM sont réalisées dans une plaque de microtitration de 96 puits. 25 µL d'une suspension virale titrée à 25 TCID₅₀ ajoutés à chaque puits. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 2h à l'étuve à 37°C, 5% CO₂. Après cette première incubation, 100

μL de milieu MEM contenant 1.10^5 cellules Hep-2 sont mis dans chaque puits et les plaques remises à l'incubateur. Quarante-huit heures plus tard, les cellules sont observées au microscope inversé (Olympus CKX41) à l'objectif x10. Le titre d'activité antivirale est représenté par l'inverse de la dilution à partir de laquelle une inhibition de l'effet cytopathique (ECP) est observée.

II.5.4 – Séparation des molécules de l'extrait par filtration sur colonne

L'extrait intestinal est fractionné en fonction du poids moléculaire. Nous avons utilisé un système de colonnes d'ultrafiltration Vivaspin® (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Allemagne). L'échantillon d'extrait est passé sur des colonnes dont les membranes ont des capacités de filtration différentes (30 ; 100 et 300 kilo daltons ou kDa). Les colonnes Vivaspin® contenant l'échantillon d'extrait intestinal sont centrifugées à 2800g pendant 15 minutes à 4°C. La fraction filtrée est recueillie et testée en parallèle avec la fraction non filtrée à la recherche de l'activité anti-CVB4E2.

II.5.5 – Electrophorèse

Une électrophorèse SDS-PAGE est réalisée afin de séparer les molécules de l'extrait intestinal selon leur poids moléculaire. La séparation est faite sur un minigel 12% Mini-Protean 3 cell (Bio-Rad), à partir d'un volume de 10 μL d'échantillon à 200V/400mA, en conditions dénaturantes, avec ou sans 2% de β -mercaptoéthanol (Bio-Rad).

II.5.6 – Récupération des bandes à partir du gel

Après lavage du gel à l'eau distillée, les bandes sont découpées au scalpel sur une surface préalablement nettoyée à l'éthanol et déposées dans un tube de 1,5 mL. Elles sont d'abord

déshydratées dans 1 mL de méthanol à 100% à température ambiante avant d'être réhydratées dans le même volume de méthanol à 30%. Les bandes sont successivement lavées 2 fois à l'eau distillée, puis 3 fois dans une solution à 100 mM de bicarbonate d'ammonium contenant 30% d'acétonitrile. Elles sont découpées en plusieurs morceaux sous forme d'émincés, lavées à l'eau distillée avant d'être séchées au SpeedVac pendant 30 mn. Les émincés de gel, remis en suspension dans du bicarbonate de sodium à 50 mM (5 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$ de gel), sont mélangés à la trypsine (5-10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) et incubés une nuit à 37°C). Après une centrifugation de 1 mn à 20000g, le surnageant riche en protéine est conservé et les protéines encore contenues dans les émincées de gel sont extraites avec 10 à 20 μL d'acétonitrile à 50% contenant 0,1% d'acide trifluoacétique à température ambiante. Le deuxième extrait est mélangé au premier et l'échantillon est testé afin de vérifier son activité antivirale.

II.5.7 - Extraction d'ARN et RT-PCR

L'extraction de l'ARN cellulaire s'est faite à l'aide de la trousse RNeasy Total RNA Isolation System (Promega). Le coffret Quant-it RNA Assay (Invitrogen) est utilisé pour le dosage de l'ARN total en plaque 96 puits avec l'appareil Mx3000P (Stratagen). Les RT-PCR sont réalisées avec le thermocycleur Perkin-Elmer-Applied Biosystems GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Le coffret Superscript™ One-step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen) est utilisé pour la réalisation des réactions de RT-PCR. Ce coffret permet la synthèse d'ADNc et son amplification en une seule étape. La transcription inverse est directement suivie par l'étape d'amplification. Le mélange réactionnel, volume de 50 μL , subit une étape préalable de transcription inverse de 30 mn à 50°C, suivie d'une étape de dénaturation de 5 mn à 94°C. L'étape d'amplification est réalisée en 35 cycles caractérisés par une dénaturation de

30s à 94°C, une hybridation de 30s à 52°C et une extension de 1 mn à 72°C. L'extension finale a duré 7 mn à 72°C. Les produits PCR sont révélés sur un gel d'agarose « DNA grade » (Type 5, Euromedex). Les séquences des amorces utilisées dans les différentes réactions de RT-PCR sont pour l'amorce sens CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG et pour l'anti-sens ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA.

III – RESULTATS

III.1 - CVB4 et pancréas

III.1.1 - Infection à CVB4E2 de cellules ductales humaines et perturbation de la formation de structures ressemblant à des ilots

III.1.1.1 – Coxsackievirus B4 peut infecter les cellules ductales humaines in vitro

Les cultures de cellules ductales pancréatiques humaines sont composées à plus de 85% de cellules CK19 positives. Les cultures primaires de cellules ductales humaines sont infectées avec du CVB4E2 titré à $2,1 \cdot 10^3$ TCID₅₀/mL. Le test de viabilité à l'Uptiblue des cultures non infectées a permis de calculer l'index de viabilité qui était croissante jusqu'à 6 jours en moyenne après le début de la culture (contre 4 – 5 jours pour les cultures infectées) (n = 3), avant de décroître rapidement ; suggérant une durée de viabilité moyenne de 4 – 5 jours pour les cultures de cellules ductales primaires infectées par le CVB4E2 (Fig 4-A). Les cultures de cellules ductales infectées ont permis une réplication active du virus. En effet, la Fig 4-B montre une augmentation du titre viral avec un pic à $6 \cdot 10^4$ TCID₅₀ mL à J3 post-infection, suivie d'une baisse rapide du titre viral en grande partie liée à l'important effet cytopathique (ECP) avec mort cellulaire mis en évidence sur la Fig 1A. La viabilité des cellules ductales infectées était plus courte que celle des cellules non infectées, avec une différence non significative (P > 0,5, Fig 4-A).

La protéine de capsid virale VP1 était détectée par IFI dans les cultures de cellules ductales primaires infectées, mais la proportion de cellules marquées est relativement faible (1,14 +/- 0.7 %, n = 3), avec un pic à 4% à J3 (résultats non publiés). L'ARN viral intracellulaire de

polarité positive et négative est mis en évidence par RT-PCR dans les extraits cellulaires (Fig 4-C).

Afin d'évaluer de façon plus précise l'étendue de l'infection, les cellules ductales sont lavées proprement avant d'être diluées successivement pour obtenir en moyenne de 1 et 10 cellules par tube. L'ARN viral est recherché par RT-PCR sans extraction comme expliqué dans le chapitre « Matériel et méthode ». L'ARN viral est ainsi détecté dans tous les tubes contenant environ 10 cellules et dans 5 des 9 tubes contenant environ 1 cellule (Fig 4-D), alors que le dernier surnageant de lavage est négatif pour la détection de l'ARN viral par RT-PCR. Afin d'affirmer que l'ARN viral détecté par cette technique de RT-PCR sans extraction est bien d'origine intracellulaire et non de l'ARN de virus fixé à la membrane cellulaire, les cellules sont infectées à +4°C ; ce qui permet la fixation du virus à la membrane cellulaire mais pas son entrée dans les cellules. Les cultures infectées et les contrôles sont ensuite lavées au bout de 2h avec du PBS froid. Dans ces conditions, aucun ARN viral n'est détecté par RT-PCR sans extraction (résultats non publiés).

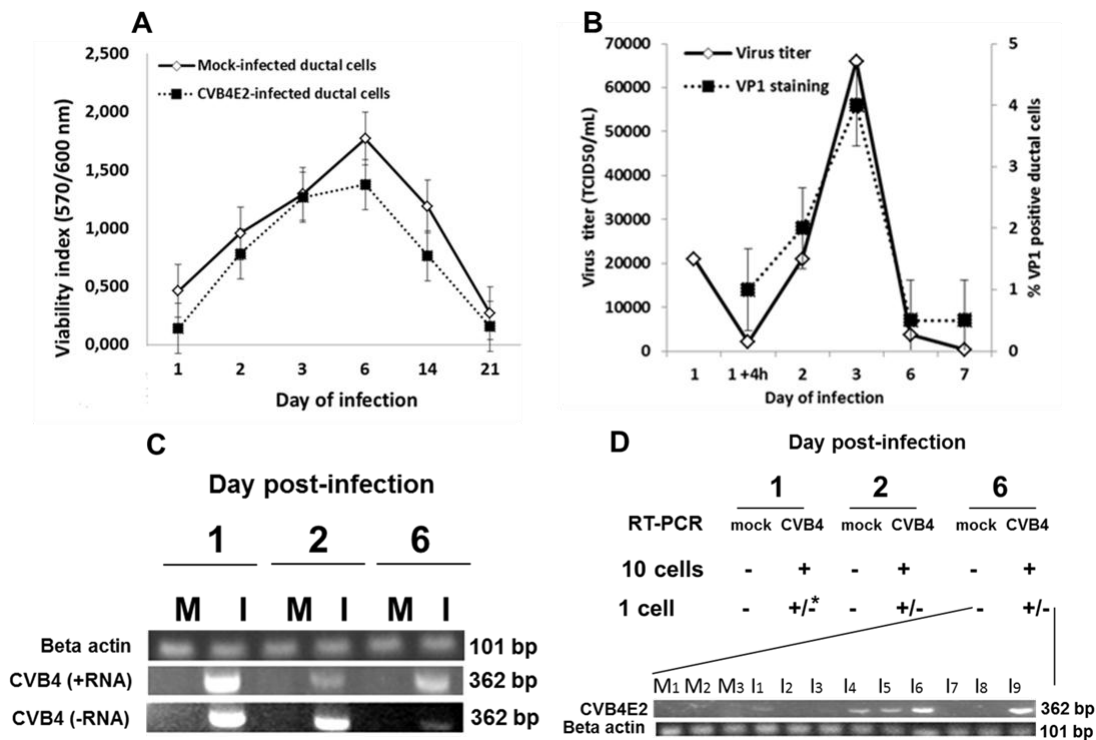


Figure 4 : Infection des cellules ductales primaires humaines par CVB4

Effet de l'infection par CVB4 sur la viabilité des cellules ductales primaires humaines évalué à l'aide du réactif UptiBlue™ (A). Les résultats sont exprimés en indice de viabilité (ratio entre l'absorbance à 570 et 600 nm) mesuré 4h après l'application du réactif dans les cultures infectées et non infectées (les résultats sont la Moy ± SD, n = 3).

Libération de particules virales infectieuses des cultures de cellules ductales et proportion de cellules infectées (B). Les titres viraux des surnageants de culture prélevés à différents moments du suivi et exprimés en TCID50/mL sur des cultures de cellules Hep-2. Les résultats d'une expérience parmi 3 autres sont présentés. Le pourcentage de cellules ductales infectées est déterminé par la détection de la protéine de capsid virale VP1 par immunofluorescence indirecte (IFI) (les résultats sont exprimés en Moy ± SD).

Gel d'agarose de la détection spécifique de brins d'ARN viral de polarité positive et négative du génome des entérovirus (EV) et de la détection de l'ARNm de la β -actine (C). La RT-PCR est réalisée à partir des extraits d'ARN total des cellules contrôles (M) (n = 3) et des cellules infectées (I) (n = 9) prélevées à J1, J2 et J6 p.i. Les résultats d'une expérience représentative parmi 3 sont présentés.

RT-PCR sans extraction d'ARN (D). les cellules ductales contrôles et celles infectées par CVB4E2 sont récoltées à J1, J2 et J6 p.i., lavées plusieurs fois au PBS froid avant d'être réparties à raison d'une moyenne de 10 (8 – 11) et 1 (1 – 3) cellules par tube. Une RT-PCR sans extraction est réalisée pour la détection spécifique de brins d'ARN positive des EV et d'ARNm de la β -actine. Le résultat de l'amplification de 12 échantillons, 3 contrôles (M) et 9 infectés (I) prélevés à J6 p.i. et contenant en moyenne 1 cellule par tube sont présentés sur le gel d'agarose. Les résultats d'une expérience parmi 3 sont présentés.

Ces résultats suggèrent qu'environ 50% des cellules des cultures de cellules primaires ductales pancréatiques humaines pourraient renfermer de l'ARN viral, confirmant que CVB4E2 peut infecter les cellules ductales pancréatiques humaines. Cependant la viabilité cellulaire des cultures infectées décroissant fortement au-delà de 4 – 5 jours post-infection, nous avons décidé d'utiliser la lignée PANC-1 comme modèle pour la suite de l'étude.

III.1.1.2 – Infection persistante des cellules PANC-1 par CVB4E2

Les cellules PANC-1 sont infectées par CVB4E2 titré à $2,1 \cdot 10^3$ TCID₅₀/mL. Le milieu de culture est renouvelé tous les 3 jours et les cultures sont suivies durant 15 jours. L'observation microscopique ne révèle aucune différence morphologique significative durant les 6 premiers jours p.i. entre les cultures infectées et les contrôles. La détermination de l'index de viabilité par UptiBlue ne révèle aucune différence significative entre les cultures PANC-1 infectées et les contrôles jusqu'à J6 p.i. Au-delà de J6, la viabilité cellulaire est moins importante pour les cellules infectées par rapport aux témoins. Un décollement de fragments de tapis cellulaire est observé dans les cultures infectées, avec beaucoup de cellules mortes dans le surnageant de culture entre J6 et J9 p.i. A J14 p.i., les cellules infectées encore adhérentes sont rares et le test de viabilité au bleu Trypan a révélé que 3% en moyenne des cellules PANC-1 infectées étaient encore vivantes, contre 68% pour les cellules non infectées (résultats non publiés).

Dans le but d'étudier l'infection à long terme des cellules PANC-1, les cellules infectées encore vivantes après la crise aiguë sont grattées à J7 et remises en culture dans de nouvelles plaques. La progénie virale, titrée sur cellules Hep-2, a mis en évidence la production et la libération de particules virales infectieuses dans les surnageants de cultures

infectées (Fig 5-A). Des titres viraux élevés sont retrouvés dans les surnageants de culture, avec un pic à 10^6 TCID50/mL entre J5 et J10 p.i. Les titres viraux dans les surnageants de culture ont ensuite baissés tout en restant relativement constant, avec des fluctuations parfois allant entre 10^5 et 10^3 TCID50/mL. Un titre viral de $2,5.10^5$ TCID50/mL était encore détectable à J260 p.i. La recherche et le titrage de particules virales dans les surnageants des cultures contrôles est effectuée, mais aucune particule virale n'est détectée (résultats non publiés).

Chaque semaine pendant les 8 premières semaines et occasionnellement par la suite jusqu'à la fin du suivi (260 jours), les surnageants de cultures sont collectés et l'ARN total cellulaire extrait afin de rechercher l'ARN viral par RT-PCR. De l'ARN viral est retrouvé dans les surnageants de culture et de l'ARN de polarité positive et négative est retrouvé dans les extraits cellulaires de J1 à la fin du suivi à J260 (Fig 5-A). Aucun ARN viral n'est retrouvé dans les surnageants ni dans les extraits des cellules contrôles (résultats non publiés).

La proportion de cellules PANC-1 infectées avec une détection en IFI de la protéine de capsid VP1 est faible, allant de 1 à 5% (résultats non publiés). Cependant lorsque les cellules infectées sont grattées, diluées puis soumises à une RT-PCR sans extraction, la proportion de cellules renfermant l'ARN viral s'avère plus élevée. En effet, un prélèvement à J30 p.i. montre une détection d'ARN viral dans 7 des 13 tubes contenant en moyenne 1 cellule par tube (nombre de cellules allant de 1 à 3) (Fig 5-B).

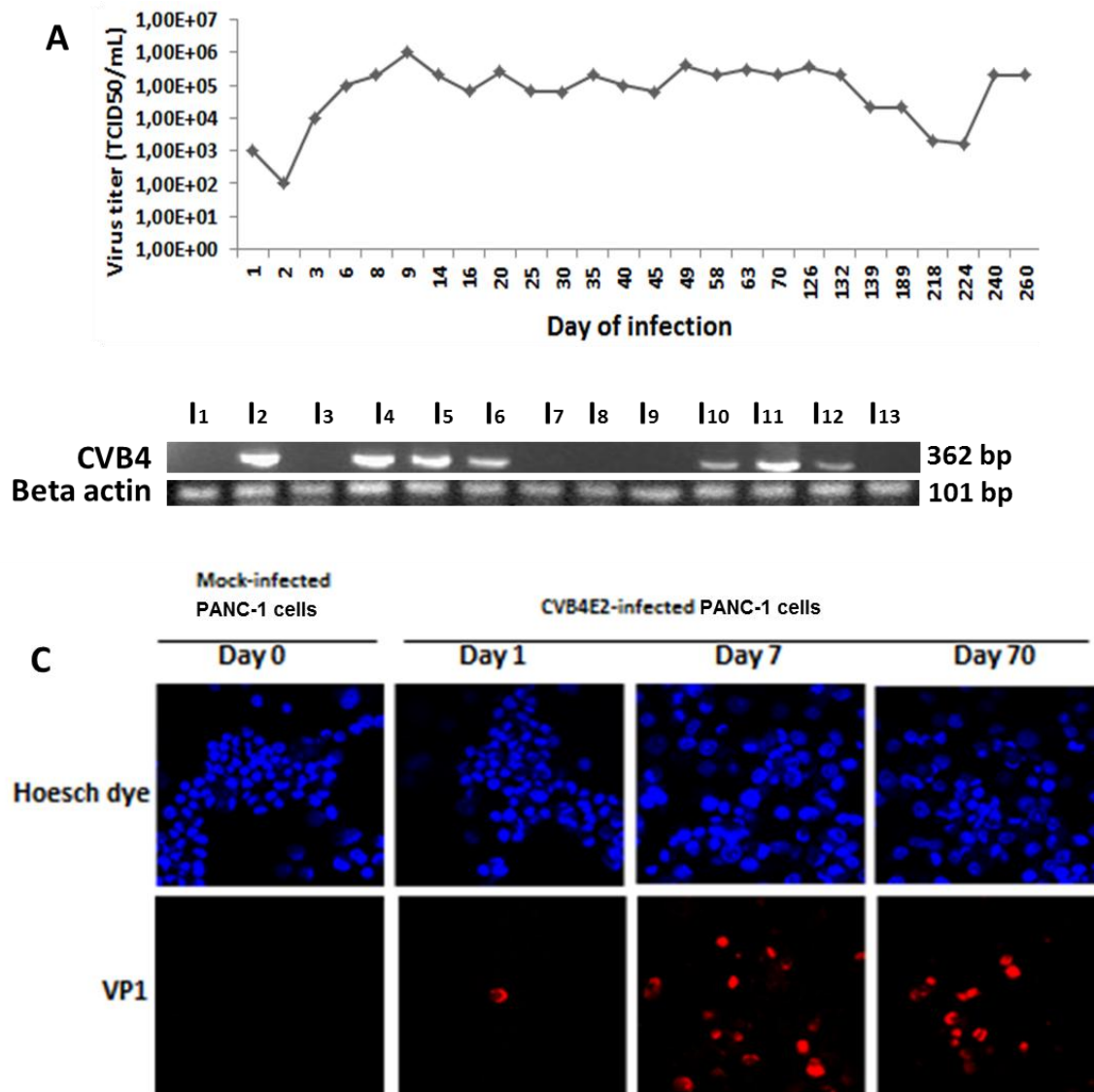


Figure 5 : Infection persistante des cellules PANC-1 par CVB4E2

Les cellules PANC-1 sont mises en culture et inoculées avec CVB4E2. Après la phase aiguë de l'infection, à J7, elles sont grattées puis remises en culture. Le grattage et remise en culture se font une fois par semaine.

Titration de la progénie virale (A). Les surnageants des cultures de cellules PANC-1 infectées par CVB4 sont recueillis tous les 3 jours. Les résultats, exprimés en TCID50/mL, sont issus d'une expérience parmi 3 autres.

RT-PCR sans extraction (B). Les cellules PANC-1 infectées sont prélevées par grattage à J30 p.i., lavées proprement au PBS froid et distribuées à raison d'une moyenne de 1 (1 – 3) cellule par tube. Une RT-PCR sans extraction est réalisée pour la détection de brins d'ARN positif des EV et d'ARNm de la β -actine. Le résultat de l'amplification de 13 échantillons est présenté sur le gel d'agarose. Les résultats d'une expérience parmi 3 autres sont montrés.

Détection de la protéine de capsid virale VP1 par IFI (C). La présence de la protéine de capsid virale VP1 est recherchée dans les cultures de cellules contrôles et celles de cellules infectées par IFI à différents temps p.i. (anticorps conjugués au TRITC). Les noyaux cellulaires sont marqués au Hoechst 33342. Les marquages fluorescents sont visualisés à l'aide d'un microscope confocale à laser Zeiss LSM 710 (X40). Les résultats représentatifs d'une expérience parmi 3 autres sont présentés.

La persistance virale est aussi étudiée. Les cellules PANC-1 chroniquement infectées sont grattées à J33 et remises en culture dans une nouvelle plaque en présence d'un antisérum neutralisant anti-CVB4E2 de lapin. Après 2 jours de culture, le milieu de culture est renouvelé et complété de l'antisérum neutralisant anti-CVB4E2 de lapin. Cette procédure est répétée au bout d'une semaine et les semaines suivantes. A chaque grattage, des cellules et du surnageant de culture sont collectés pour la recherche d'ARN viral par RT-PCR. Au bout de 4 mois de suivi (soit 16 passages), l'ARN viral est détectable dans les surnageants et les extraits des cellules infectées traitées avec de l'antisérum contrôle de lapin, tandis qu'aucun ARN viral n'est détecté dans les échantillons de cellules infectées traitées avec l'antisérum anti-CVB4E2 de lapin (résultats non publiés). Considéré globalement, ces résultats sont en faveur d'une infection persistante de type « état porteur » (carrier state) dans laquelle les nouvelles particules virales ne sont produites que par une partie des cellules infectées.

III.1.1.3 – L'infection par CVB4E2 peut perturber l'expression de Pdx-1 et la transformation des cellules PANC-1 en structures ressemblant à des ilots (ICA)

Les ARNm de Pdx-1 et de CK19 sont détectés aussi bien dans les ductales primaires que dans les cellules PANC-1. Une infection persistante des cellules PANC-1 ayant été obtenue, nous avons exploré les conséquences de cette persistance au niveau l'expression de certains marqueurs. L'ARNm de l'IGF2, CK19 et MxA est retrouvé dans les extraits cellulaires des cellules PANC-1 infectées comme dans les cellules contrôles, et ce, tout au long du suivi (résultats non publiés). A contrario, l'ARNm de Pdx-1 n'est plus détecté dans les cellules PANC-1 au-delà de J36 p.i. (Fig 6-A).

L'exposition brève des cellules PANC-1 non infectées à l'action de la trypsine suivie de leur culture dans un milieu sans SVF a entraîné, entre J2 et J4, une réorganisation du tapis en structures ressemblant à des îlots (ICAs) formées de grappes de cellules arrondies (Fig 6-B). A contrario, le même traitement appliqué aux cellules PANC-1 chroniquement infectées à J40 p.i. aboutit certes à la formation d'ICA, mais ces derniers sont formés de structures beaucoup moins compactes, avec beaucoup moins de cellules. Il s'agit de structures moins homogènes formées de cellules dont la grande majorité est morte comme le révèle le test au bleu Trypan 6 jours après le début du test de transformation en ICA. A la grande différence des ICA issus des cellules non infectées dont les structures tridimensionnelles sont restées compactes avec très peu de cellules mortes au test de bleu Trypan au jour 6 après le début du test (Fig 6-B).

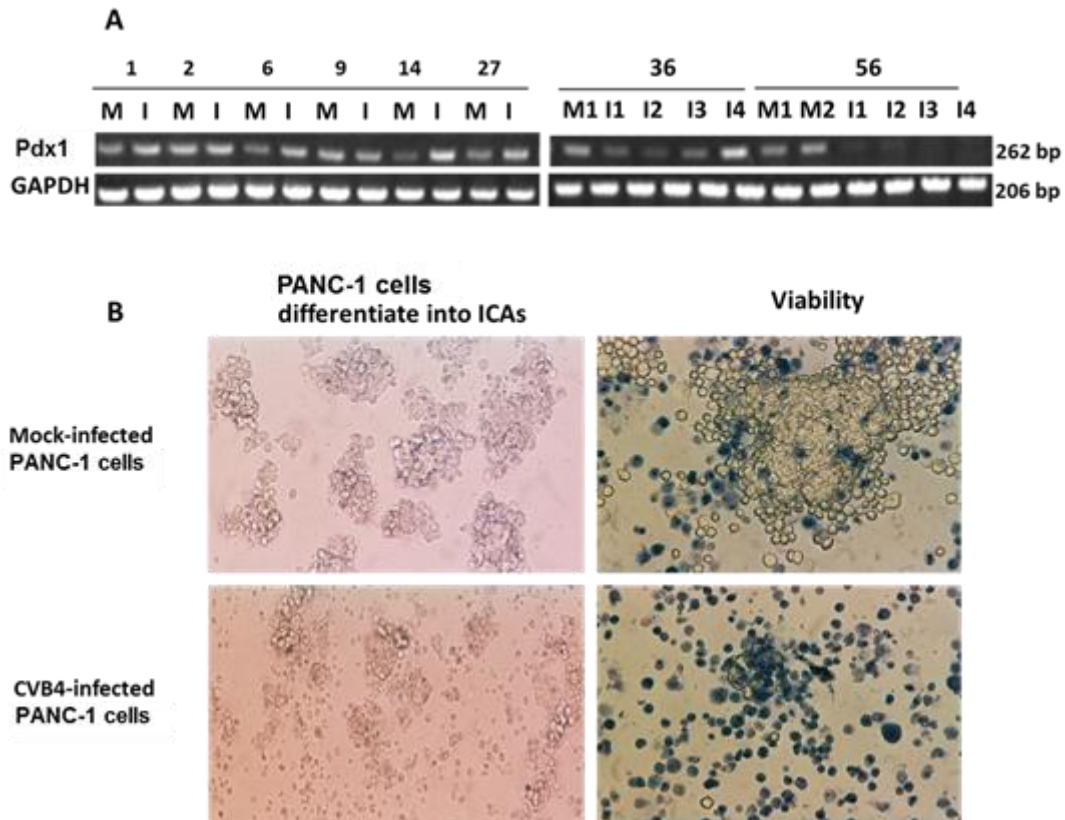


Figure 6 : Conséquences de l'infection par CVB4 dans des cultures de cellules PANC-1

Expression de l'ARNm de Pdx1 (A). Gel d'électrophorèse des résultats de la RT-PCR de Pdx1 (en haut) et de GAPDH (en bas). Les extraits d'ARN total des cellules contrôles (M) et infectées (I) prélevées à J56 p.i. sont testés par RT-PCR à la recherche d'ARNm de Pdx1.

Différenciation en structure ressemblant à des îlots (ICA) (B). Les cultures de cellules PANC-1 contrôles et infectées sont soumises à un test de différenciation en ICA. A J40 p.i., les cellules sont brièvement exposées à la trypsine avant d'être remises en culture dans un milieu sans sérum de veau fœtal (SFM) à 37°C. Des structures ressemblant aux ICA sont observées au microscope inversé à l'objectif X40 entre J2 et J4 après exposition au milieu SFM. La viabilité de ces ICA est évaluée avec le test de viabilité cellulaire au bleu trypan. Les résultats d'une expérience parmi 3 autres sont présentés.

Dans une autre expérience, les cellules PANC-1 non infectées sont d'abord soumises à un test de transformation en ICA puis infectées au bout du 4^{ème} jour. Dans ces conditions, des structures peu compactes, dissociées sont obtenues à J2 p.i., avec une majorité de cellules mortes au test de bleu Trypan.

Nous avons imaginé d'étudier l'infection du tissu pancréatique à différents âges de la vie. La taille des souris est une limitation à la réalisation de travaux expérimentaux concernant le pancréas. Nous avons donc décidé d'évaluer l'infection du pancréas de rat.

III.1.2 - Etude de l'infection à CVB4 du pancréas de rat à différents âges de la vie et conséquences.

III.1.2.1 – Les culture organotypiques de pancréas de rat sont infectables par CVB4E2

Les pancréas de rat Wistar sont prélevés et mis en culture dans du milieu DMEM 4,5g/L de glucose. Le test de viabilité cellulaire par UptiBlue a permis d'évaluer l'index de viabilité cellulaire des cultures organotypiques de pancréas de rat. Cette viabilité tissulaire s'étend sur 7 jours en moyenne (n=3), avec une décroissance régulière entre J2 et J7 (Fig.7-A). Les pancréas de rat Wistar âgés de 21 jours (J21) sont inoculés avec du CVB4E2 titré à $1,44.10^7$ TCID50/mL. La détection régulière par RT-PCR de brins d'ARN viral dans les extraits de tissus pancréatiques précédemment inoculés et celle de la protéine de capsid virale VP1 montrent que le tissu pancréatique de rat est infectable par CVB4E2 *in vitro* avec une réplication virale caractérisée par la détection de brins d'ARN viral positifs et négatifs entre J1 et J9 post infection (Fig.7-B). Comme le révèle le marquage VP1 par IFI des fragments de pancréas de rat de J21 traités à J7 p.i., l'infection est essentiellement localisée au niveau des îlots de Langerhans et de certains ganglions (Fig.7-C). Aucun marquage VP1 n'est mis en évidence sur les acini (résultats non montré).

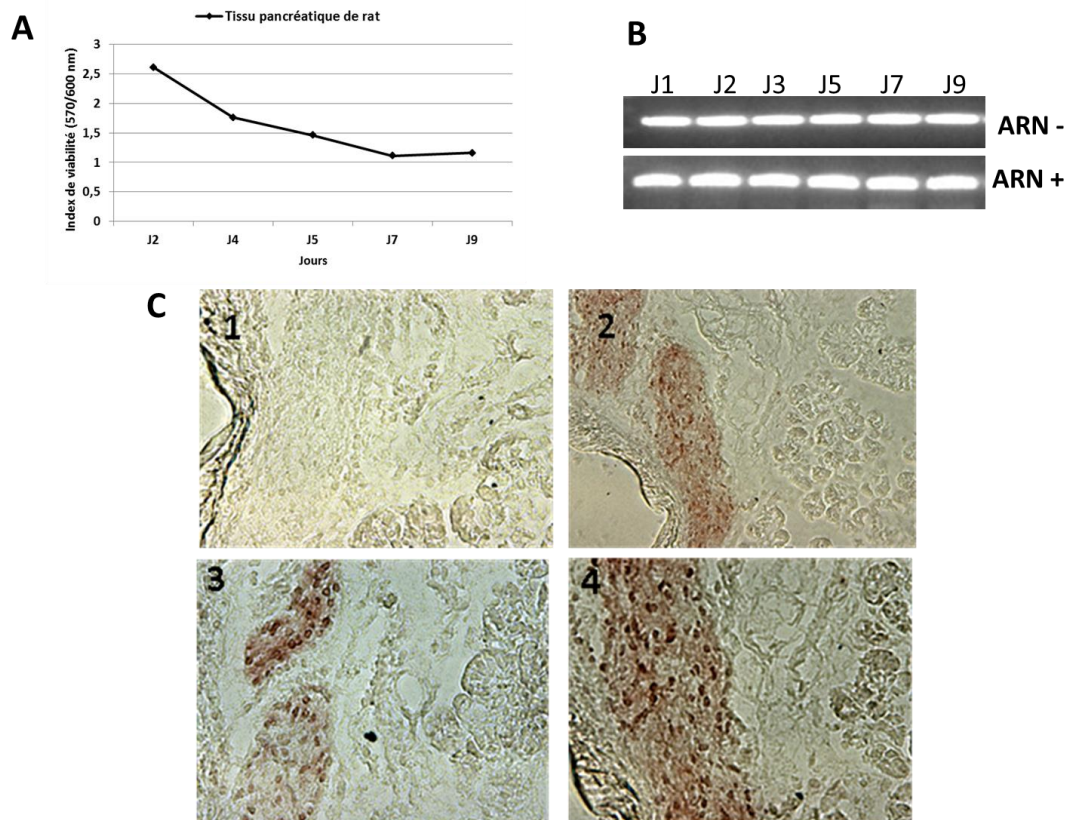


Figure 7 : Le tissu pancréatique de rat est infectable in vitro par CVB4

Les fragments de pancréas de rat âgés de 21 jours (J21) sont mis en culture dans du milieu DMEM juste après sacrifice et dissection de l'animal. L'évaluation de la viabilité cellulaire est réalisée avec le réactif Uptiblu® (A). Les cultures de fragments de pancréas de rat sont inoculées avec CVB4E2 titré à $1,44 \cdot 10^7$ TCID50/mL. La RT-PCR est appliquée aux extraits cellulaires à la recherche d'ARN de polarité positive et négative (B). La détection de la protéine de capsid virale VP1 est réalisée par IHC sur des coupes de fragments de pancréas (C). C-1 : coupe de pancréas témoin non infecté (x10) ; C-2 : coupe de pancréas infecté (x10) ; C-3 et C-4 : coupes de pancréas infectés (x20).

III.1.2.2 - Réplication de CVB4 dans des fragments de pancréas de rat à différents âges

Afin d'étudier les différences de sensibilité à l'infection par CVB4E2 du tissu pancréatique de rat à différents âges de la vie, des pancréas d'embryon de rat de 21 jours (EJ21) et de rats âgés de 7 jours (J7), 21 jour (J21), 40 jours (J40) et 8 mois (M8) sont inoculés par CVB4E2 et suivis pendant une dizaine de jours. La quantification de l'ARN entéroviral intracellulaire des

extraits par PCR en temps réel rapportée à l'ARN total de chaque extrait permet une comparaison entre les différents échantillons. Les profils présentés à la Fig.8 montrent une augmentation régulière de la quantité d'ARN viral quel que soit l'âge considéré, allant par exemple de $4,10.10^3$ à J2 p.i. à $7,8.10^4$ copies/ng d'ARN total à J9 p.i. pour les fœtus de 21 jours et de $4,19.10^3$ à $1,54.10^5$ copies/ng d'ARN total pour les rats adultes de 8 mois (M8) pour la même période (Fig.8). Les quantités d'ARN viral rapportées à l'ARN total sont plus importantes à J6 et à J9 dans les échantillons issus de rats M8, par rapport aux échantillons issus de rats d'autres âges de la vie, cependant la différence n'est pas significative.

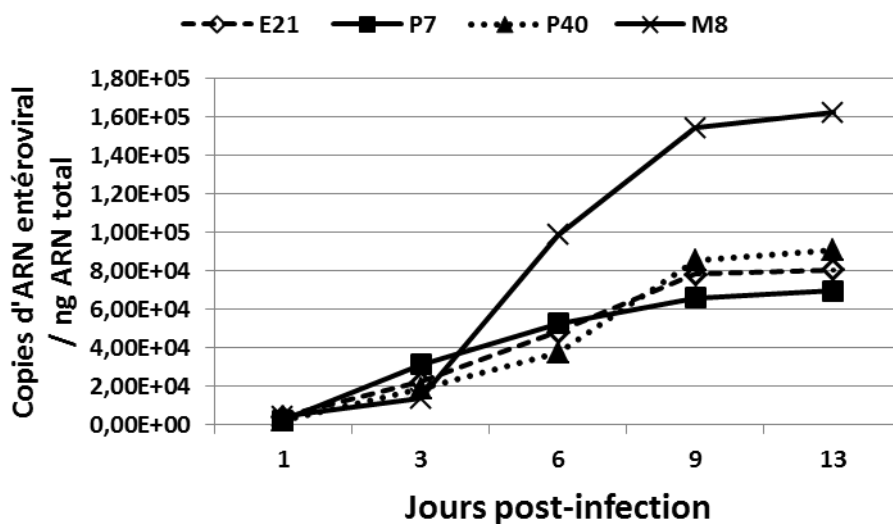


Figure 8 : Détection d'ARN viral dans des cultures de fragments de pancréas inoculés avec CV-B4

Les fragments de pancréas prélevés chez des embryons de rats âgés de 21 jour de gestation (EJ21) et de rats âgés de 7 jours (J7), 21 jours (J21), 40 jours (J40) et 8 mois (M8) sont mis en culture et inoculés avec CVB4E2 titré $1,44.10^7$ TCID50/mL. La PCR en temps réel réalisée sur les extraits cellulaires des fragments prélevés au cours du suivi a permis la détection et la quantification de l'ARN viral.

Les différents résultats présentés ci-dessus montrent dans nos modèles humains et animaux que CVB4 est capable in vitro d'infecter des cellules ductales considérées comme une source

de cellules précurseur de cellules β , et que les cellules endocrines sont infectables à différents âges de la vie.

L'infection des cellules pancréatiques endocriniennes et/ou celle de leurs précurseurs peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse du DT1. Dans le but de réduire les risques d'infection de ces cellules, et dans le cadre d'un effort de réflexion pour mettre en place une politique de prévention vis-à-vis de ces virus nous avons étudié des moyens naturels de lutte contre les entérovirus d'une part et contre le développement du DT1 d'autre part.

III.2 - Prévention des infections à CVB4

III.2.1 - Le lait humain peut neutraliser Coxsackievirus B4 in vitro

III.2.1.1 – Activité neutralisante anti-CVB4 de la fraction aqueuse du lait maternel

Les échantillons de lait entier maternel inoculés aux cellules Hep-2 présentent une cytotoxicité jusqu'à la dilution 1/32 (Fig 9-A). En raison de cette cytotoxicité, les échantillons de lait sont centrifugés (10000g, 1h, 4°C) afin de séparer les fractions aqueuse et crémeuse, qui seront diluées dans du milieu MEM avant d'être inoculées aux cellules. La fraction lipidique est cytotoxique jusqu'à la dilution 1/64, alors que la fraction aqueuse (diluée au ¼ dans le MEM) n'a pas d'effet cytotoxique notable sur les cultures de cellules Hep-2 (Fig 9-B). L'ECP caractéristique des entérovirus, observé lorsque les cultures cellulaires sont inoculées avec CVB4 (Fig 9-C), est inhibé lorsque cette inoculation des cellules avec CVB4 se fait en présence de la fraction aqueuse diluée du lait maternel (Fig 9-D).

Sept échantillons de lait maternel, capables d'inhiber l'ECP induite par CVB4 (titre allant de 64 à 1024), sont séparés en fractions aqueuse et lipidique puis testés pour leur activité anti-CVB4. Pour chacun de ces échantillons, le titre d'activité anti-CVB4 de la fraction aqueuse est égal ou supérieur à celui de l'échantillon de lait non fractionné ; alors que la fraction lipidique ne présente pas d'activité neutralisante au-delà du seuil de cytotoxicité (1/64) (Fig 9-E).

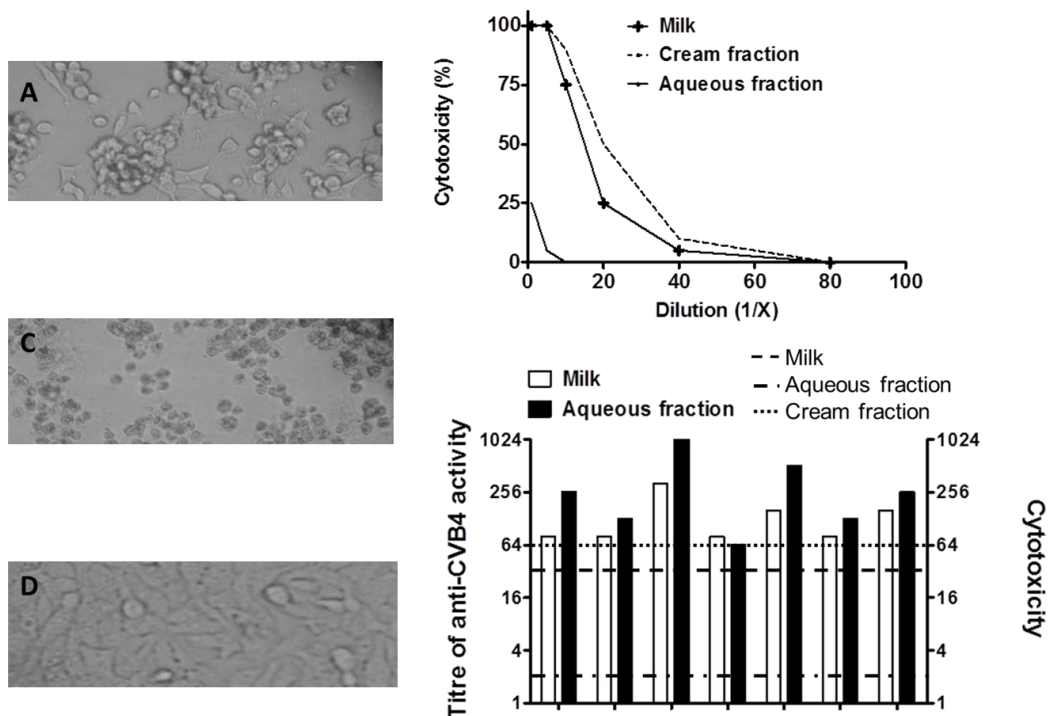


Figure 9 : La fraction aqueuse du lait maternel a une faible cytotoxicité et est capable de neutraliser CVB4 in vitro (Sane et al. *J Med Virol*, in press)

Les cellules Hep-2, inoculées avec du lait maternel (25% dans le milieu de culture), sont incubées durant 48h avant d'être observées au microscope inversé à l'objectif x10. Le résultat d'une expérience représentative parmi 3 autres est présenté (A).

Plusieurs dilutions de lait maternel entier et des fractions aqueuses et crémeuses obtenues après centrifugation sont inoculées aux cultures de cellules Hep-2. Le niveau de cytotoxicité est exprimé en pourcentage. Les résultats représentatifs obtenus à partir d'échantillons d'un unique donneur parmi 6 autres sont présentés (B).

Les résultats d'une expérience représentative parmi 3 autres des cultures de cellules Hep-2 observées 48h après être inoculées avec CVB4 à raison de 25 TCID50 / puits (C).

CVB4 (25 TCID50/ puits) est incubé 2h à 37°C en présence de fractions aqueuses d'échantillons de lait maternel (25% dans le milieu de culture). Ce mélange est ensuite inoculé aux cultures de cellules Hep-2 qui sont observées au microscope inversé après 48h d'incubation à 37°C. Les résultats d'une expérience représentative parmi 3 autres est présenté (D).

Activité neutralisante anti-CVB4 de 7 échantillons de sérums et de leurs fractions. Les titres de cytotoxicité de la fraction aqueuse, du lait entier et de la fraction crémeuse de 1/2, 1/32 et 1/64 respectivement. Aucune activité anti-CVB4 des fractions crémeuses n'est observée (E).

Contrairement au lait maternel, la fraction aqueuse du lait de vache (n = 10) et celle de divers laits maternisés (n = 10) ne présente aucune activité anti-CVB4 (Résultats non montrés).

III.2.1.2 – Profil d'activité neutralisante anti-CVB4 du lait maternel

Les échantillons de colostrum de 49 donneuses fraîchement collectés sont centrifugés afin de récupérer la fraction aqueuse. Une collecte successive de lait maternel est réalisée auprès de 10 donneuses afin de tester l'activité neutralisante anti-CVB4 du colostrum, du lait de transition et du lait mature. Les titres anti-CVB4 du colostrum sont compris entre < 2 et 1024. Un titre supérieur ou égal à 64 est retrouvé chez 36 des 49 échantillons testés, et des titres allant de moins de 2 à 32 sont retrouvés dans 13 autres échantillons (< 2, 4, 8, 16 et 32 dans 1, 2, 5 et 5 échantillons respectivement) (médiane = 128 ; Fig 10-A). Les titres sont plus faibles dans le lait de transition et le lait mature (73 +/-73 et 31 +/- 39 respectivement) que dans le colostrum (256 +/-306) (P = 0.006 et P = 0.002 respectivement) (n=10) (Fig 10-B).

L'activité neutralisante anti-CVB4 des échantillons de lait de 15 donneuses vivant dans une région différente du nord de la France a été étudiée. Les échantillons de lait maternel, collectés au Congo en Afrique sub-Saharienne, sont congelés à -20°C. Les échantillons de lait sont ensuite convoyés dans de la carboglace à Lille où ils sont centrifugés afin de récupérer la fraction aqueuse. Des échantillons successifs ont été obtenus chez 10 donneuses. Dans les laits de transition et mature, les titres sont moins élevés que dans le colostrum (Fig 10-C). Pour chacun des échantillons de colostrum collectés chez les 15 donneuses, les titres d'activité anti-CVB4 sont égaux ou supérieurs à 128 (allant de 128 à 512, médiane = 192, moy +/- ET: 282 +/-155, n=15) (voir Fig 10-D).

Dans la mesure où les échantillons du Congo étaient préalablement congelés, leur titres d'activité ont été déterminés en parallèle avec des échantillons congelés de Lille afin de comparer les activités neutralisantes anti-CVB4 de laits maternels issus de deux régions du globe avec des épidémiologies des infections à entérovirus différentes. Comme le montre la Fig 10-D, les valeurs des titres d'activité sont plus basses pour les échantillons de lait de Lille (allant de < 2 à 256, médiane = 32, moy +/- ET : 50 +/-60, n= 49) que pour ceux du Congo (P < 0,0001).

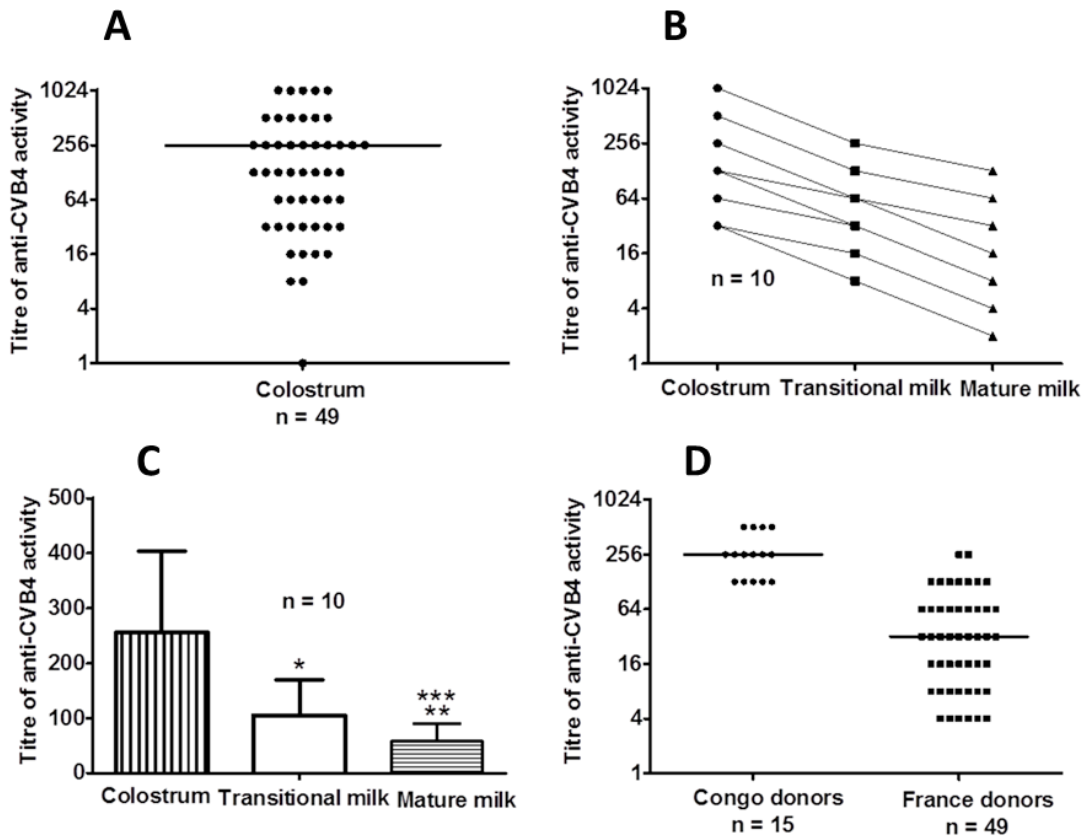


Figure 10 : Profils de l'activité neutralisante anti-CVB4 de la fraction aqueuse d'es échantillons de lait maternel (*Sane et al. J Med Virol, in press*)

Représentation individuelle de l'activité neutralisante anti-CVB4 de la fraction aqueuse des échantillons de colostrum. Les résultats sont présentés sous forme d'inverse de la dernière dilution neutralisant l'ECP de CVB4 (10^3 TCID₅₀/mL) sur les cultures de cellules Hep-2. Les échantillons proviennent de 49 donneuses habitant le Nord de la France. L'activité anti-CVB4 de chaque échantillon est testée juste après collection. La barre horizontale représente la valeur moyenne (A).

Variations individuelles du titre de l'activité neutralisante anti-CVB4 des fractions aqueuses issues de prélèvements consécutifs de lait maternel chez 10 donneuses vivant au Nord de la France. *P = 0,006 : lait de transition vs colostrum ; **P = 0,006 : lait mature vs lait de transition ; ***P = 0,002 : lait mature vs colostrum (B).

Dix échantillons consécutifs de lait maternel du Congo sont collectés et conservés congelés avant d'être acheminés à Lille pour l'étude de l'activité neutralisante anti-CVB4 du colostrum, du lait de transition et celle du lait mature. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. *P = 0,013 : lait de transition vs colostrum ; **P = 0,021 : lait mature vs lait de transition ; ***P = 0,006 : lait mature vs colostrum (C).

Activité neutralisante anti-CVB4 individuelle d'échantillons de colostrums congelés issus de 15 donneuses du Congo et de 49 donneuses du Nord de la France. Les barres horizontales représentent les valeurs moyennes (D).

Au lactarium, le lait maternel est systématiquement pasteurisé puis congelé à -20°C en attendant d'être distribué. Par conséquent nous avons évalué l'activité anti-CVB4 du colostrum avant et après pasteurisation. L'activité anti-CVB4 des colostrums des 49 donneuses de Lille est significativement plus élevée pour les échantillons non pasteurisée ($P < 0,0001$; $n = 49$) et les titres d'activité antivirale sont fortement diminués pour les échantillons ayant été à la fois pasteurisés puis congelés au moins 6 mois (Fig 11).

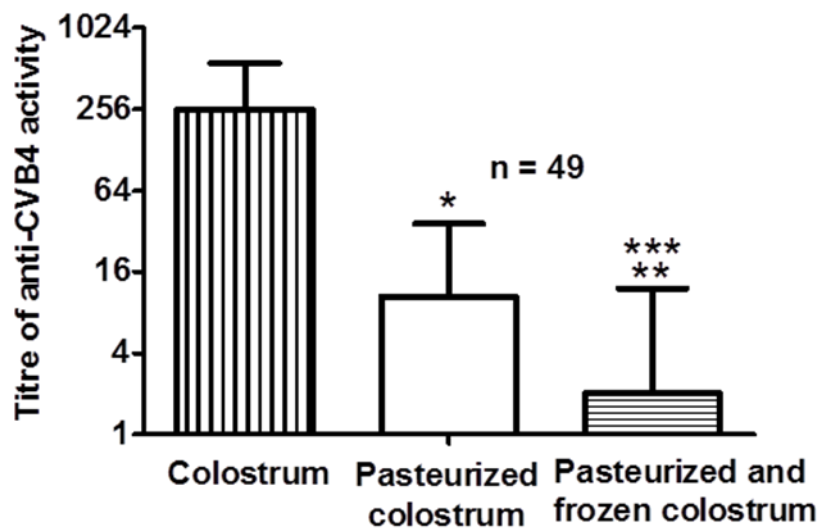


Figure 11 : Les procédures de traitement des échantillons de lait au lactarium altèrent l'activité anti-CVB4 du colostrum (*Sane et al. J Med Virol, in press*)

Des échantillons de colostrum issus de 49 donneuses sont testés pour leur activité anti-CVB4 dès leur collection ; un aliquote de chaque échantillon est pasteurisé et un autre pasteurisé puis congelé avant d'être testé à leur tour pour l'activité anti-CVB4. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. * $P < 0,0001$: colostrum pasteurisé vs colostrum non pasteurisé ; ** $P < 0,001$: colostrum pasteurisé et congelé vs colostrum pasteurisé ; *** $P < 0,0001$: colostrum pasteurisé et congelé vs colostrum non pasteurisé et non congelé.

III.2.1.3 – Rôle des IgA dans l'activité anti-CVB4 du lait maternel *in vitro*

Nous avons émis l'hypothèse que les IgA sécrétoires (sIgA) étaient impliquées dans l'activité neutralisante anti-CVB4 du lait maternel. Les échantillons de colostrum sont testés pour leur activité anti-CVB4 avant et après appauvrissement en sIgA par incubation avec des billes d'agarose enrobées de jacaline pendant toute une nuit à 4°C sous agitation. L'activité anti-CVB4 des colostrums traités avec la jacaline est significativement diminuée ($P = 0,0059$; $n = 10$), comme le montre la Fig 12. Ces résultats suggèrent fortement que les sIgA jouent un rôle dans l'activité anti-CVB4 du lait maternel mise en évidence *in vitro* dans notre étude.

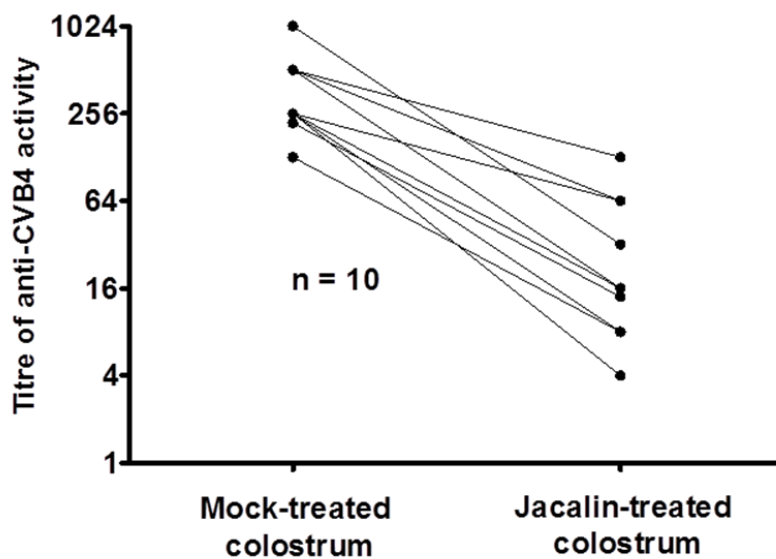


Figure 12 : Rôle des IgA dans l'activité anti-CVB4 du colostrum (*Sane et al. J Med Virol, in press*)

Les échantillons de colostrum issus de 10 donneuses sont mélangés avec des billes d'agarose enrobées de jacaline ou de PBS (contrôle), puis incubées sous agitation constante toute une nuit à température ambiante. Le mélange est centrifugé et le surnageant recueilli pour l'évaluation de l'activité anti-CVB4.

La possibilité que l'activité anti-CVB4 du lait maternel puisse être prédite par celle du sérum chez la même personne a été étudiée. Des sérums provenant de 25 des 49 donneuses de colostrum sont testé pour leur activité anti-CVB4. Les titres d'activité du sérum vont de 16 à 2048 et sont égaux ou supérieurs à 64 pour la plus part des échantillons testés (moy +/- ET : 605 +/- 548; médiane = 512). Des titres individuels élevés d'activité anti-CVB4 dans le sérum sont associés à de très faibles titres d'activité dans le lait maternel, et vice versa pour d'autres donneuses (Fig 13). Il n'y a aucune corrélation entre les titres d'activité dans le sérum et ceux dans le lait maternel ($P = 0,37$).

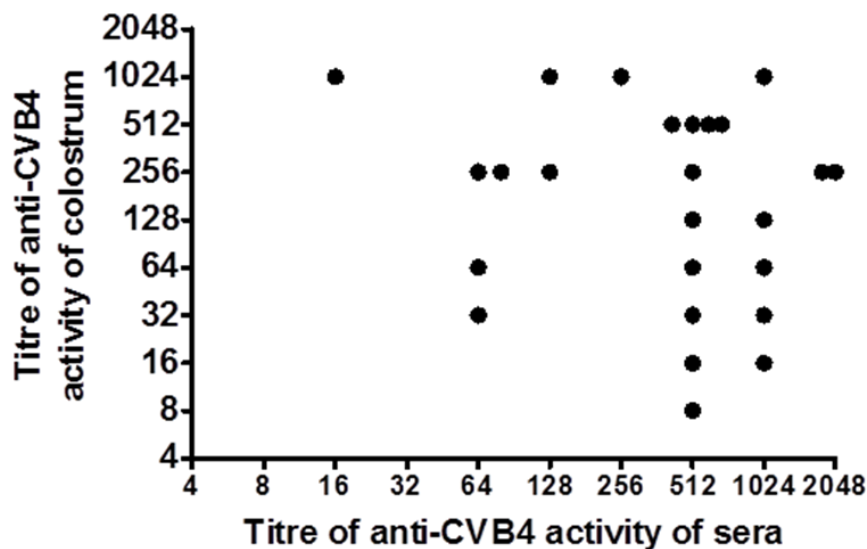


Figure 13 : Représentation individuelle de l'activité neutralisante anti-CVB4 des échantillons de colostrum et de sérum prélevés chez 25 donneuses (*Sane et al. J Med Virol, in press*)

En plus de l'évaluation de l'activité anti-CVB4 du lait maternel in vitro, une étude de sa capacité à moduler l'incidence du DT1 et la flore intestinale dans un modèle animal a été entreprise.

III.2.2 - Effet du lait humain sur l'incidence du diabète de type 1 et sur la flore commensale intestinale chez la souris NOD

III.2.2.1 – Le lait humain écrémé réduit l'incidence du diabète chez la souris NOD

Les souris NOD/LTJ femelles âgées de 4 semaines à la réception sont réparties en 2 groupes de 8 souris chacun durant les 2 essais successifs. Les animaux du groupe contrôle ont un accès illimité à l'eau stérile et les autres ont un accès illimité au lait humain écrémé. Les deux essais ont abouti au même effet global, avec une incidence du diabète significativement plus élevée (Fig.14, $p < 0.001$) dans le groupe contrôle comparativement au groupe lait humain. En effet, lors de l'essai 1, nous avons 2/8 (25%) souris qui ont déclenchées la maladie dans le groupe lait humain, contre 6/8 (75%) dans le groupe contrôle. Ces chiffres sont respectivement de 1/8 (12,5%) et 6/8 (75%) lors de l'essai 2 (Pour les deux essais groupés, le test du χ^2 est significatif : $\chi^2 = 10,16$ et $P = 0,0014$, $n = 32$). Cependant, et ce dans les deux essais, l'effet protecteur du lait maternel écrémé est surtout notable dans la prévention des diabètes à déclaration tardive que dans ceux à déclaration rapide. Lorsque l'on considère l'ensemble des 2 essais, les 3 souris du groupe ayant accès au lait maternel ont toutes (100%) déclaré la maladie avant la semaine 20 du suivi, avec une moyenne de déclenchement à 17 semaines, alors que dans le groupe contrôle 7 souris ont déclenché la maladie avant la semaine 20 et 5 au-delà, avec une moyenne de déclenchement à 21,75

semaines. La différence entre ces deux moyennes de déclenchement dans les deux groupes n'est cependant pas significative.

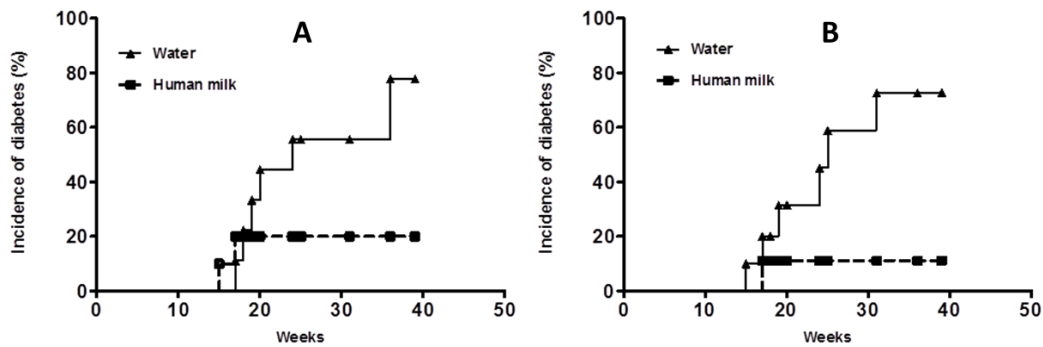


Fig. 14 : Incidence du diabète de type 1 chez des souris NOD femelles ayant accès au lait maternel

Incidence cumulée du diabète de type 1 (DT1) chez les souris femelles NOD ayant accès au lait humain écrémé (Human milk n = 8 en A et n = 8 en B) et chez les souris contrôle ayant accès à l'eau (Water, n = 8 en A et n = 8 en B). La glycémie est mesurée une fois par semaine à l'aide d'un lecteur de glycémie grâce à une goutte de sang prélevée à la queue de l'animal et une souris est considérée diabétique après deux mesures successives de la glycémie égales ou supérieures à 14 mmol/L. En considérant l'ensemble des deux essais (A et B), une diminution significative ($p < 0,001$) de l'incidence du DT1 est observée dans le groupe de souris alimentées au lait humain.

Les bifidobactéries représentent le groupe bactérien majoritaire dans le microbiome jusqu'à une semaine post-partum chez les enfants nés à terme. Les bifidobactéries sont aussi naturellement présente chez la souris, mais à des taux très variable selon le portage de la mère à la naissance. Ce groupe bactérien est également prédominant chez les enfants allaités au sein, leur croissance étant directement et positivement influencée par les apports du lait maternel en bifidobactéries (Martin, Appl Environ Microbiol. 2009). Par conséquent le décompte et l'analyse des populations de bifidobactéries revêtent toute leur importance d'autant plus que des études ont suggéré que les bifidobactéries contribuaient

significativement à la santé chez l'homme comme chez la souris en influençant une flore intestinale équilibrée et diversifiée (Wen, Nature 2008 ; Fanning, PNAS 2012 ; Tanaka R. Clinical effects of bifidobacteria and lactobacilli. In: Fuller R, Heidt P J, Rusch V, Waaij D V D, editors; Probiotics: prospects of use in opportunistic infections. 1995. pp. 141–157).

III.2.2.2 – Des bifidobactéries sont isolées à partir des selles de souris NOD

L'isolement et le décompte des colonies de bifidobactéries sont effectués à partir de trois milieux de culture (Beerens, MRS et gélose au sang Columbia agar supplémentée de gentamycine) afin d'améliorer la détection de ces bactéries. Cependant, les bifidobactéries ne sont détectées et isolées que dans l'essai 1, l'ensemencement des différents échantillons dans les milieux de culture appropriés n'a pas permis la détection de bifidobactéries. D'autre part, aucun ADN de bifidobactérie n'est mis en évidence suite à l'extraction et à l'amplification d'ADN à partir des selles de souris de l'essai 2.

Ainsi seule la cinétique du dénombrement des bifidobactéries au cours du suivi de l'essai 1 est présentée à la Fig.15-A et 15-B. Les bifidobactéries (*B. globosum* en particulier) sont détectées dans les selles de souris NOD dès la réception des animaux, une semaine avant le début de l'étude, avec des taux variant selon les animaux de 3,9 log cfu/g de selles à 4,7 log cfu/g de selles. Les populations de bifidobactéries sont très stables et comparables entre les deux groupes de souris (contrôle et lait humain), avec un dénombrement bactérien s'étalant de moins de 3 log cfu/g de selles à plus de 9 log cfu/g de selles. Les bifidobactéries sont détectées plus particulièrement pendant 3 périodes : entre les semaines 8 et 16 (S8-S16), S17-S24 et S25-S33 chez les animaux survivant non diabétiques. Les pics de détection des bifidobactéries dans le groupe de souris ayant accès au lait humain sont similaires à ceux

observés dans le groupe contrôle. L'analyse statistique avec *mixed model* confirme une tendance linéaire très significative du décompte des bifidobactéries au cours du temps ($p < 0,0001$). Le nombre de bifidobactéries n'est pas significativement influencé par le lait. Cependant une influence significative ($p < 0,0001$) du temps d'exposition et du régime alimentaire est observée sur la population de bifidobactéries lorsque ces deux paramètres sont considérés ensemble.

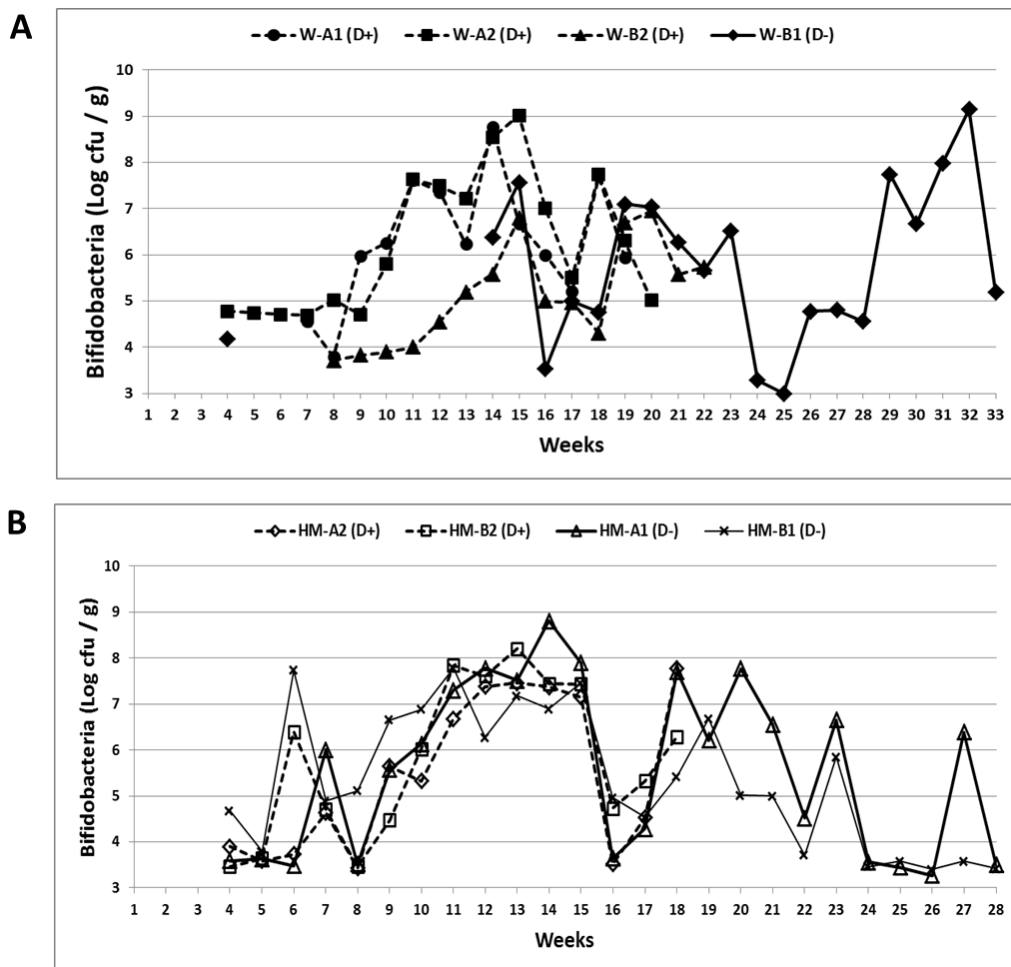


Fig.15 : Cinétique du dénombrement des Bifidobactéries totales chez les souris femelles NOD

Les Bifidobactéries sont dénombrées à partir d'échantillons de selles de souris ayant accès à l'eau (A) ou au lait humain (B) collectées une fois par semaine etensemencés sur les milieux de culture Beerens, MRS et sur gélose au sang Columbia agar contenant de la gentamycine.

L'effet du lait maternel sur autres populations bactériennes constituant la flore intestinale et son lien possible avec l'incidence du diabète ont été aussi analysés.

III.2.2.3 – Variation des bactéries intestinales dans les deux essais

Parmi les bactéries intestinales, les entérobactéries, les entérocoques et les lactobacilles sont retrouvés dans les prélèvements de souris au cours des deux essais. Ces différents groupes bactériens étaient initialement détectés dans les selles des animaux dès la réception de ces derniers. Les courbes de dénombrement des entérobactéries au cours du suivi des deux essais mettent en évidence de variations importantes au cours du temps (Fig.16-A et 16-B). Les entérobactéries se composent principalement d'E coli dont le décompte varie significativement durant le suivi ($p < 0,003$). L'accès au lait maternel influence significativement et de façon indépendante les populations d'E coli ($p < 0,02$; Fig 16-C) ou comme cofacteur si on prend en compte l'accès au lait et la durée d'exposition ($p < 0,013$). Analysés ensemble, les cofacteurs « essai » et « temps d'exposition » ont une influence significative sur les populations d'E coli selon le *mixed model* ($p < 0,001$).

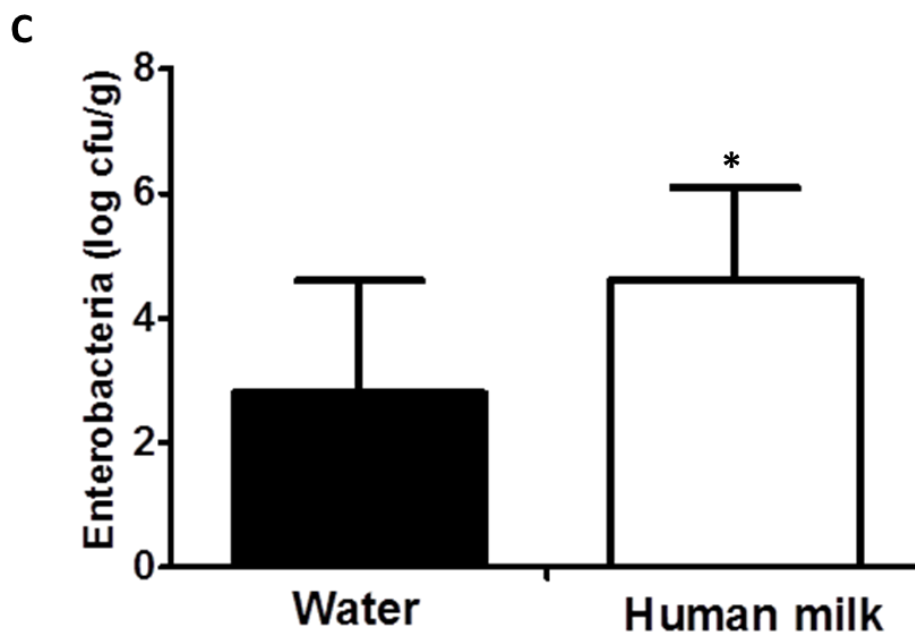
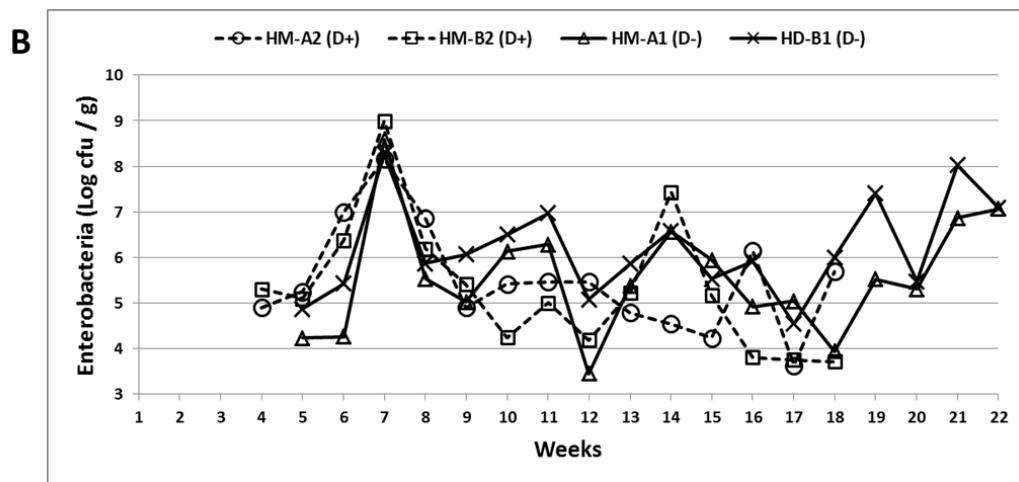
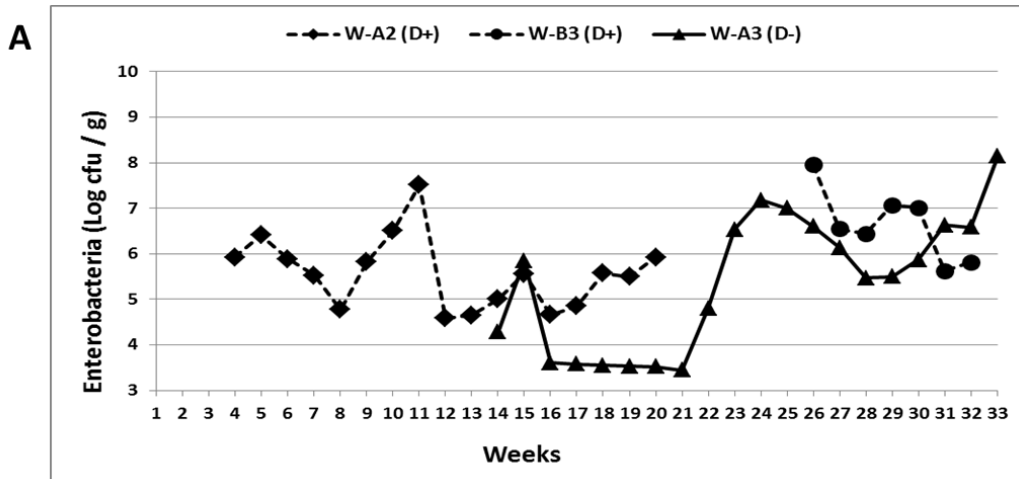


Fig.16 : Dénombrement des Entérobactéries totales

La moyenne des dénombrements lors des deux essais dans les échantillons de selles des entérobactéries totales chez les souris NOD femelles ayant accès à l'eau (A) et au lait humain (B). La moyenne + SD de l'ensemble des dénombrements d'entérobactéries chez l'ensemble des souris contrôles (Water) et des souris ayant accès au lait humain (C) * $p < 0,02$: moyenne + SD animaux contrôles ayant accès à l'eau vs moyenne + SD des entérobactéries totales du groupe de souris ayant accès au lait humain.

L'analyse des dénombrements de lactobacilles (Figure 17) par le *mixed model* met en évidence des variations très significatives de leurs populations au cours du temps ($p < 0,0001$). L'essai affecte les populations de lactobacilles en tant que facteur indépendant ($p < 0,04$) ou comme cofacteur du temps d'exposition ($p < 0,00021$). Lorsqu'elle est analysée ensemble avec le temps d'exposition, la prise de lait maternel par les souris NOD influence significativement ($p < 0,0023$) les populations de lactobacilles.

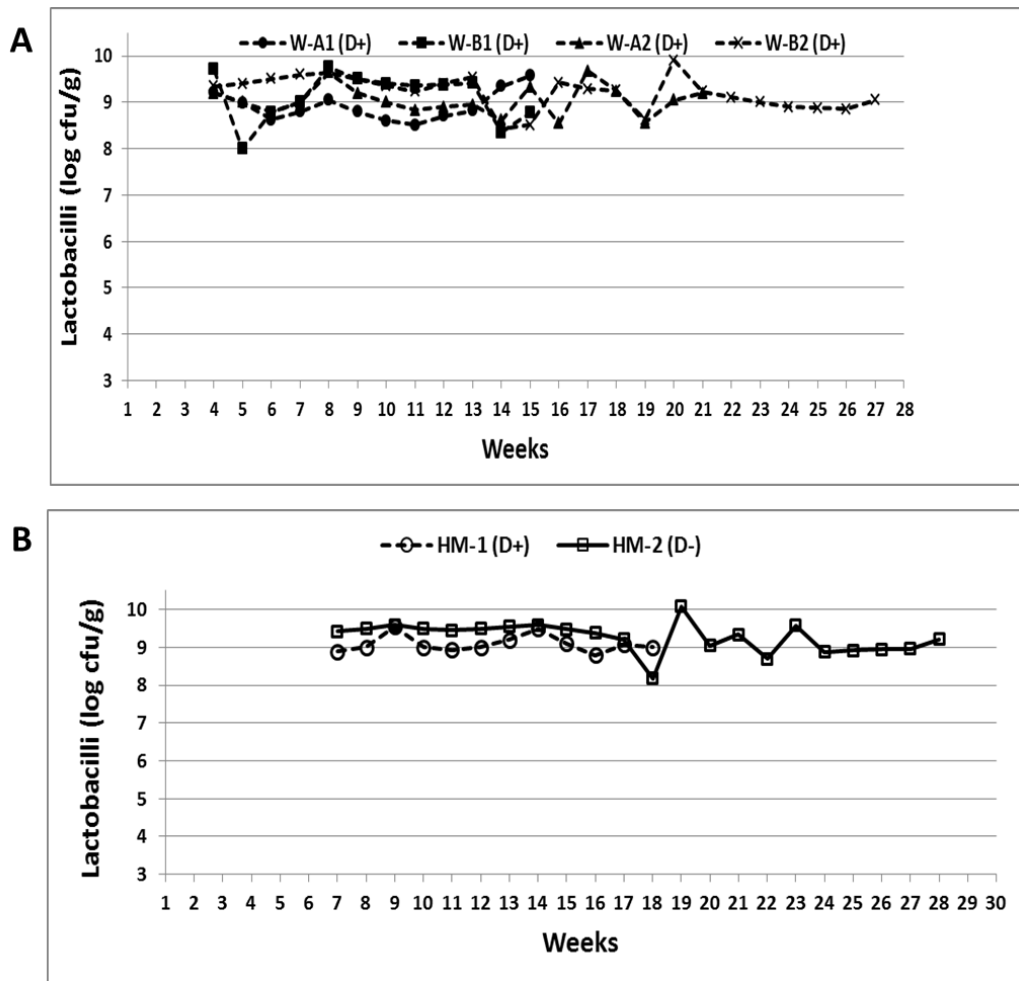


Fig.17 : Dénombrement des populations de lactobacilles

Les lactobacilles sont dénombrées à partir d'échantillons de selles de souris du groupe contrôle ayant accès à l'eau (A) et du groupe ayant accès au lait humain (B) collectées une fois par semaine et ensemencés sur le milieu de culture MRS.

Les entérocoques, en particulier *Enterococcus faecalis* et *Aerococcus. viridans*, varient de façon significative au cours du temps ($p < 0,0001$) (Figure 18). L'essai affecte les populations de *A. viridans* en tant que facteur indépendant ($p = 0,007$). Cependant ni la prise de lait, ni le déclenchement du diabète n'affectent les populations *E. faecalis*, alors que ces deux facteurs influencent les populations d'*A. viridans* en tant que cofacteurs du temps ($p = 0.001$ et 0.048 , respectivement).

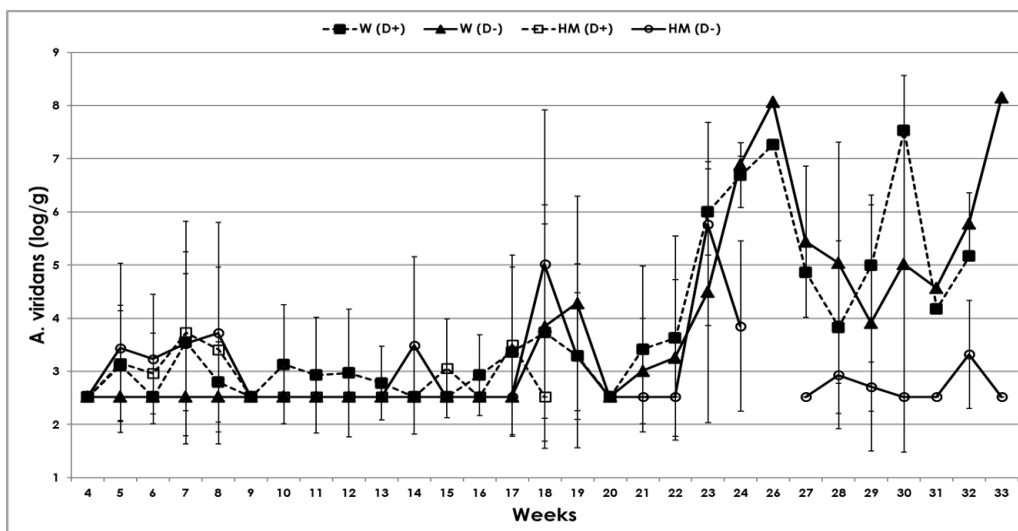


Fig.18 : Dénombrement des populations d'entérocoque *A. viridans*

Les populations de *A. viridans* sont dénombrées à partir d'échantillons de selles de souris du groupe contrôle (W) et du groupe ayant accès au lait humain (HM) collectées une fois par semaine etensemencés sur le milieu de culture Slanetz.

III.2.2.4 - Variation des populations d' *Anaerotruncus* et *Enterorhabdus*

Bactérie anaérobie en forme de tige, *Anaerotruncus* est isolée sous ses formes sporulées et végétatives. A l'image des autres marqueurs bactériens, les populations d'*Anaerotruncus* varient, sous leurs deux formes, de façon significative au cours du temps ($p < 0,0001$). Elles ne sont cependant affectées par aucun autre facteur (résultats non montrés).

Enterorhabdus, une autre bactérie anaérobie en forme de tige, n'est mise en évidence que sous sa forme sporulée. L'excrétion des spores dans les selles des animaux varie significativement au cours du temps ($p < 0,0001$), mais aussi en fonction du déclenchement du diabète (Figure 19). Les populations d'*Enterorhabdus* sont significativement plus importantes ($p = 0,03$) chez les souris non diabétiques que chez les souris diabétiques (Fig

19-A), quel que soit le groupe considéré (Fig 19-B). Toutefois, aucun lien entre le déclenchement du diabète et la prise de lait humain n'est observé.

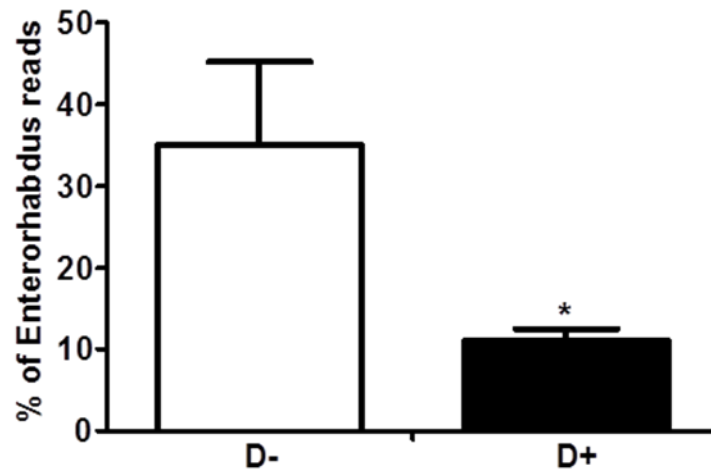


Fig.19 : Variation des populations d'*Enterorhabdus* au cours du suivi

Les populations d'*Enterorhabdus* sont dénombrées à partir d'échantillons de selles de souris collectées une fois par semaine. La moyenne + SD du dénombrement des populations d'*Enterorhabdus* chez les souris non diabétiques (D-) et diabétiques (D+) est représenté. * $p= 0.0016$.

III.2.2.5 – Macrobiote intestinal des souris NOD survivantes

A la fin du suivi, les animaux survivants sont sacrifiés et leur flore intestinale analysée. De rares souris contrôles étaient encore vivantes après 33 semaines de suivi. L'analyse de la flore montre que la colonisation intestinale des entérobactéries diffère entre les animaux contrôles et ceux alimentés au lait humain. *E. coli* a préférentiellement colonisé l'iléon, le caecum et le colon des souris contrôles, alors qu'une observation similaire est faite pour *K. pneumoniae* chez les souris alimentées au lait humain. Les formes végétatives d'*Anaerotruncus sp.* ont été retrouvées dans le colon des souris contrôles, mais pas chez les animaux alimentés au lait humain.

Les autres organes (reins, poumons, rate, foie) ont été rarement contaminés par les bactéries. Une souris contrôle non diabétique avait des bactéries dans le foie (2.5 log cfu clostridium/g). La seconde souris contrôle non diabétique a présenté une contamination du sang (lactobacillus 3.3log cfu/ml et Bacillus 4.36 log cfu/ml) et de la rate (streptococcus 4.27log cfu/g, *Propionibacterium* 2.06 log cfu/ml). Aucune autre souris ne présentait de bactéries dans ses organes intestinaux.

	Control		hDM
	D+	D-	D-
Mice (number)	2	2	3
<i>Distal Ileum</i>			
Enterobacteria	3.40 ± 0.88	4.43 ± 1.42	3.36 ± 0.05
<i>Klebsiella</i>	ND	ND	3.24 ± 0.10
<i>E. coli</i>	3.40 ± 0.88	4.43 ± 1.42	2.68 ± 0.16
Lactobacilli	7.35 ± 0.67	7.54 ± 0.36	8.34 ± 0.58
<i>L.johnsonii</i>	6.83 ± 0.93	6.99 ± 0.47	7.99 ± 0.81
<i>L. reuteri</i>	7.17 ± 0.55	7.39 ± 0.32	8.01 ± 0.44
Anaerotruncus	ND	ND	2.29 (1)
Enterorhabdus*	ND	2.91 (1)	ND
enterococci	3.17 (1)	3.39 ± 0.37	3.45 ± 0.96 (2)
clostridia	ND	ND	ND
<i>Caecum</i>			
Enterobacteria	4.56 ± 1.79	5.27 ± 2.05	3.78 ± 0.15
<i>Klebsiella</i>	3.19 (1)	2.99 (1)	3.78 ± 0.15
<i>E. coli</i>	4.21 ± 2.29	5.23 ± 2.10	3.40 (1)
Lactobacilli	7.67 ± 0.06	7.51 ± 0.52	7.91 ± 0.55
<i>L.johnsonii</i>	7.39 ± 0.05	6.93 ± 0.58	7.66 ± 0.53
<i>L. reuteri</i>	7.34 ± 0.07	7.38 ± 0.50	7.55 ± 0.57
Anaerotruncus	1.66 (1)a	ND	NDb
Enterorhabdus	4.29 (1)	2.72 (1)	ND
enterococci	2.5 (1)	2.34 ± 0.73	2.78 (1)
clostridia	ND	ND	ND
<i>Colon</i>			
Enterobacteria	5.68 ± 1.52	6.19 ± 2.03	4.12 ± 0.55
<i>Klebsiella</i>	4.77 (1)	2.39 (1)	3.85 ± 0.92
<i>E. coli</i>	5.55 ± 1.69	6.19 ± 2.03	3.32 ± 0.50
Lactobacilli	8.73 ± 0.53	8.37 ± 0.06	8.97 ± 0.48
<i>L.johnsonii</i>	8.43 ± 0.54	7.72 ± 0.07	8.67 ± 0.46
<i>L. reuteri</i>	8.43 ± 0.53	8.26 ± 0.05	8.66 ± 0.50
Anaerotruncus	3.31 ± 0.1	3.28 ± 0.1	ND
Enterorhabdus	ND	4.94 ± 0.44	ND
enterococci	3.58 ± 0.33	ND	3.56 ± 0.23 (2)
clostridia	2.82 (1)	3.16 (1)	3.2 ± 0.36

Tableau 2 : Dénombrement de la flore microbienne chez les animaux survivants

Après l'analyse des facteurs pouvant expliquer la protection conférée par le lait humain vis-à-vis du DT1 chez la souris NOD, nous avons étudié les facteurs de protection naturelle actifs contre le CVB4 présents dans l'environnement intestinal de la souris conventionnelle.

III.2.3 – L'extrait intestinal murin peut neutraliser Coxsackievirus B4 in vitro

III.2.3.1 – L'extrait intestinal murin possède une activité neutralisante anti-CB4E2

Après 24h de trempage dans du PBS 1X à 4°C, les préparations intestinales sont centrifugées puis filtrées. Afin d'éviter la cytotoxicité propre de l'extrait intestinal, les échantillons sont pré-dilués au ¼ avant chaque test. Lorsque les cultures de cellules Hep-2 sont inoculées avec du CVB4E2, à raison de 25 TCID₅₀ de virus pour 10⁵ cellules, en présence de l'extrait intestinal de souris convenablement dilué, l'ECP caractéristique des entérovirus est inhibé. L'activité anti-CVB4E2 de l'extrait intestinal prélevé chez 11 souris ICR est présentée dans la Fig.20. Cette activité est variable d'une souris à une autre, allant de 8 à 512 (n = 11). Aucune activité comparable anti-CVB4E2 n'est mise en évidence dans le sérum des souris (résultats non montrés).

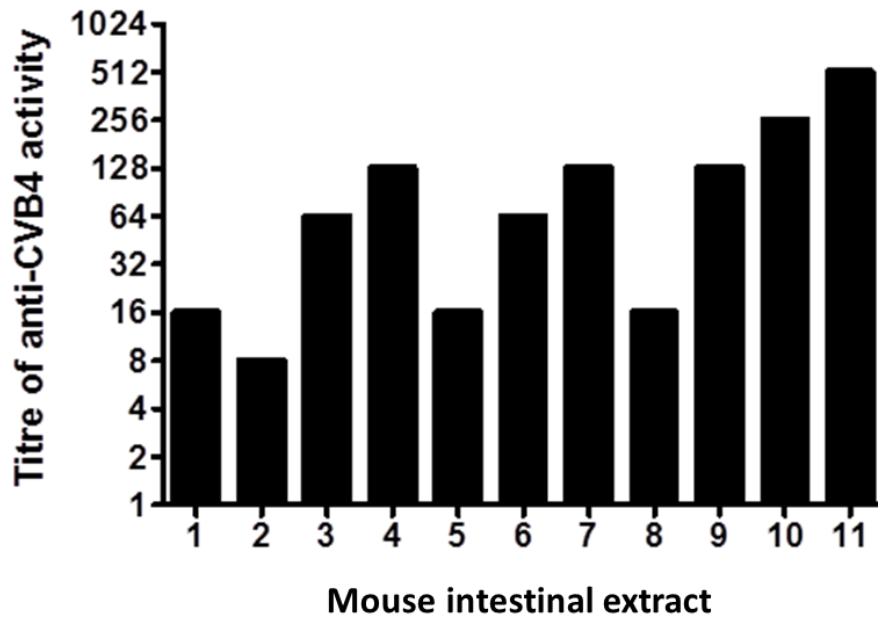


Fig.20 : Le milieu intestinal de souris possède une activité neutralisante anti-CB4E2

Représentation individuelle de l'activité neutralisante anti-CVB4E2 de l'extrait intestinal de souris. Les cultures de cellules Hep-2, inoculées avec CVB4E2 en présence de l'extrait intestinal de souris (25% dans le milieu de culture), sont incubées pendant 48h sous 5% CO₂ à 37°C, puis observées au microscope inversé. Le titre neutralisant est représenté par l'inverse de la dernière dilution qui neutralise l'effet cytopathique (ECP) de CVB4E2 sur les cultures de cellules Hep-2. Les échantillons proviennent de 11 souris ICR-CD1.

III.2.3.2 – L'extrait intestinal murin inhibe l'infection des cellules à une étape précoce du cycle

Afin de savoir si l'extrait intestinal murin agit avant ou pendant la pénétration du virus dans la cellule, l'échantillon est préalablement incubé avec le virus pendant 2 heures puis ce mélange est inoculé aux cultures de cellules ou il est d'emblée mis en présence du virus et des cellules pendant 2 heures. Pour savoir si le produit agit après l'infection, les cellules sont inoculées avec le virus pendant 2h puis après plusieurs lavages, l'extrait intestinal est ajouté.

Les résultats de ces tests montrent que seule la préincubation du virus et de l'échantillon 2h avant l'inoculation des cellules entraînait une inhibition de l'ECP. Les RT-PCR réalisés sur les

extraits cellulaires 2h après l'inoculation du virus montrent qu'aucun ARN viral intracellulaire n'est détecté dans la condition où les cellules sont inoculées après préincubation du virus et de l'échantillon ; alors que de l'ARN viral intracellulaire est retrouvé dans les deux autres conditions (cellules d'emblées mise en présence de l'échantillon et le virus ou cellules d'abord inoculées pendant 2h avant l'ajout de l'échantillon). Ces résultats suggèrent fortement que le principe actif vis-à-vis de CVB4 agit à un stade très précoce du cycle infectieux de cet agent auquel il se lit pour le neutraliser (Figure 21).

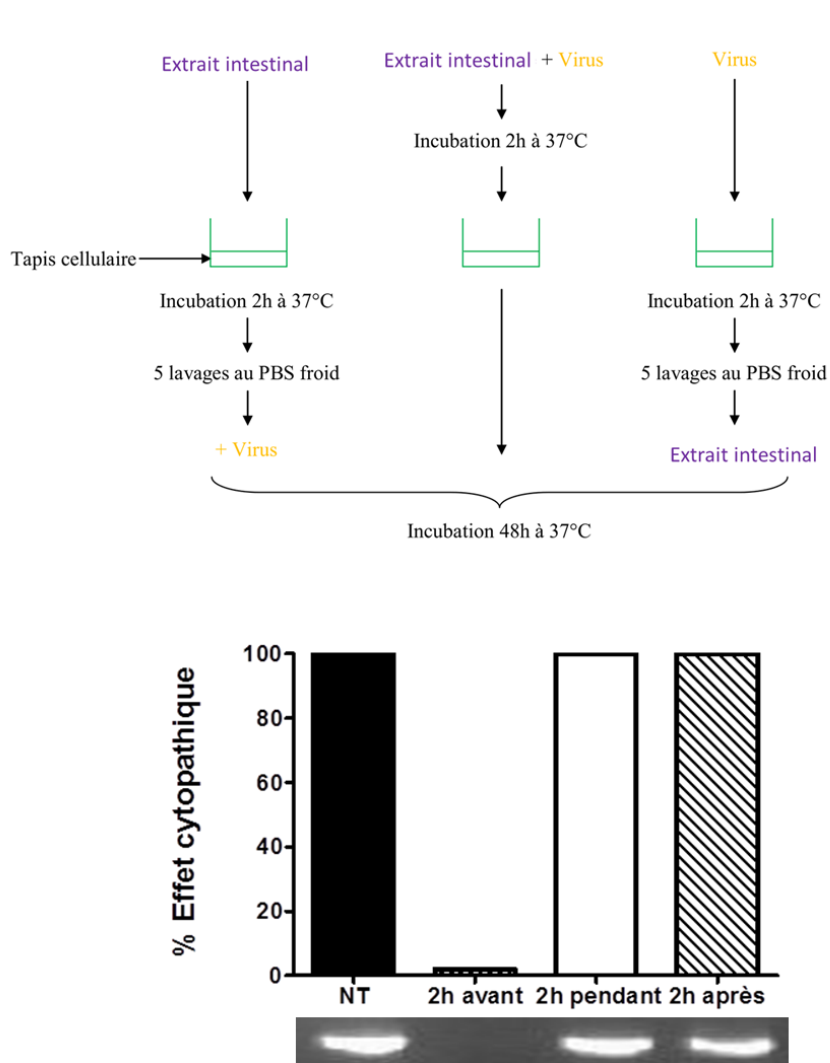


Fig.21 : Mécanisme d'action de l'extrait intestinal murin

L'extrait intestinal est préalablement incubé avec le virus pendant 2h avant que le mélange ne soit inoculé aux cultures de cellules Hep-2 (2h avant). L'extrait intestinal est d'emblée mis en présence du virus et des cellules durant 2h (2h pendant). Les cellules Hep-2 sont inoculées avec le virus pendant 2h avant que l'extrait intestinal murin ne leur soit ajouté (2h après). L'ECP est évalué au microscope inversé après une incubation de 48h à 37°C sous 5% CO₂.

III.2.3.3 - Les extraits intestinaux murins neutralisent le pouvoir infectieux de coxsackievirus B4 et B3, et de poliovirus mais pas celui du virus de l'encéphalomyocardite (EMC)

L'activité des extraits intestinaux a été testée vis-à-vis de différents entérovirus, CVB4, CVB3 et poliovirus type 1, et vis à vis du virus de l'encéphalomyocardite (EMC) appartenant au

genre Cardiovirus de la famille des Picornaviridae. Les extraits intestinaux inhibent le pouvoir infectieux de CVB4, CVB3 et poliovirus type 1 in vitro mais pas celui de l'EMC (Fig 22).

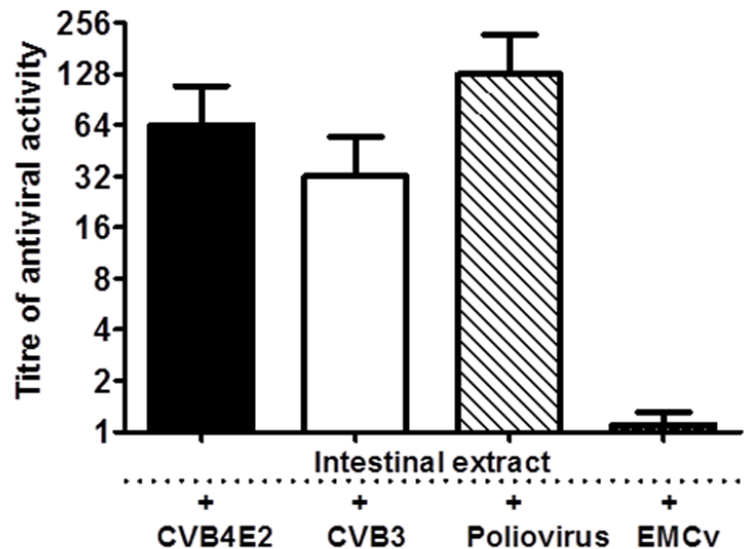


Fig.22 : Spectre d'activité antivirale de l'extrait intestinal murin

L'extrait intestinal de deux souris est préalablement incubé pendant 2h avec différents virus (CVB4E2, CVB3, Poliovirus ou EMCv à 10^3 TCID₅₀/mL) avant que le mélange ne soit inoculé aux cultures de cellules Hep-2. L'ECP est évalué au microscope inversé après une incubation de 48h à 37°C sous 5% CO₂. Les résultats, exprimés en titre neutralisant, représente l'inverse de la dernière dilution qui neutralise l'ECP du virus concerné sur les cultures de cellules Hep-2. Les résultats représentent les moyennes + SD de 3 expériences.

III.2.3.4 – Isolement du principe actif de l'extrait intestinal

Nous avons décidé d'isoler le principe actif des extraits intestinaux. Les échantillons ont été filtrés successivement sur des colonnes d'exclusion dont les mailles ont des limites de séparation différentes, de 30 kDa à 300 kDa. Les colonnes contenant l'échantillon de mucus sont centrifugées à 2800g pendant 15 minutes à 4°C. Les filtrats (F1) sont recueillis et testés en parallèle avec l'extrait intestinal dont ils sont issus (Fig.23). Une activité anti-CVB4 dont le

titre est proche de celui des extraits intestinaux a été retrouvée dans les filtrats obtenus après passage des échantillons sur colonnes de séparation de 300 kDa, mais pas après passage sur colonnes de séparation de 30 et 100 kDa. Ces résultats indiquent que l'activité anti-CVB4 des extraits intestinaux peut être isolée à partir d'une fraction de ces extraits obtenue après filtration sur colonne de séparation de 300 kD (Fig 23).

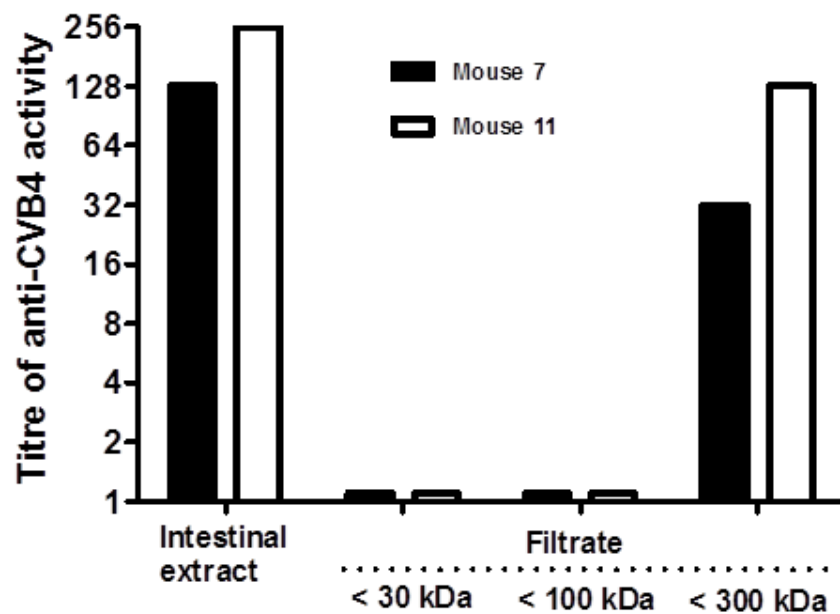


Fig.23 : Isolement de l'activité anti-CVB4E2 par filtration sur colonne

L'extrait intestinal de deux (S7 et S11) souris est filtré sur différentes colonnes (30, 100 et 300 kDa) de séparation de molécules selon le poids moléculaire. Le filtrat obtenu est testé en parallèle avec l'extrait initial pour son activité anti-CVB4E2 sur des cultures de cellules Hep-2.

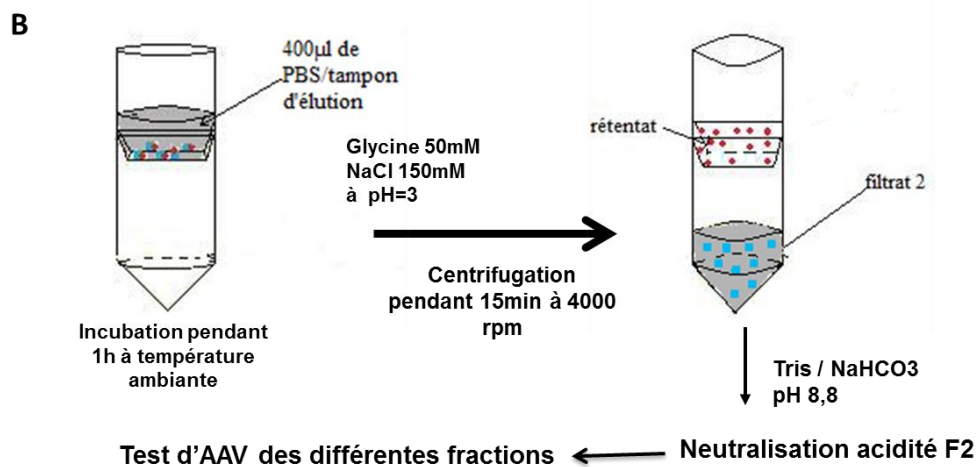
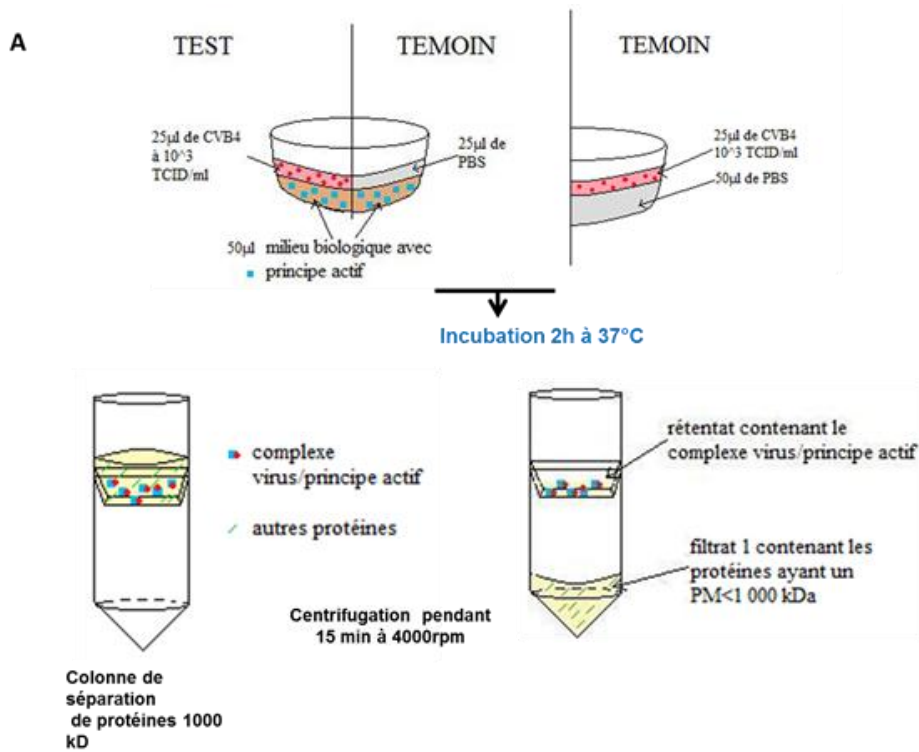
Pour isoler davantage le principe actif anti-CVB4 de l'extrait intestinal, nous avons mis à profit le fait qu'il se lie à CVB4. 50 µl de filtrat d'extrait intestinal obtenu après séparation sur colonne de 300 kDa ont été mélangés à 25 µL de CVB4E2 titré à 10^3 TCID₅₀/mL dans des

puits d'une plaque de microtitration et incubés à 37°C et 5% CO₂. Au bout de 2 heures le mélange contenant le complexe formé par le principe actif et le virus est centrifugé dans une colonne 1000 kDa à 2800g pendant 15mn à 4°C (Fig.24-A). Le filtrat (1^{er} filtrat) est récupéré et le rétentat qui comporte le complexe est repris dans 200 µL de tampon de dissociation pour dissocier le complexe virus-principe actif. Au bout d'1h, la suspension est ensuite centrifugée à 4000 rpm pendant 15mn à 4°C pour récupérer le filtrat (2^{ime} filtrat) (Fig.24-B).

Lorsque les extraits intestinaux sont incubés avec du PBS, le 1^{er} filtrat possède une activité anti-CVB4. Les titres des extraits et filtrats sont identiques ou différents d'une dilution comme l'indique la figure 25-C. Le 2^{ime} filtrat obtenu après élution lorsque le virus a été incubé avec du PBS ne possède pas d'activité anti-CVB4. A l'opposé, lorsque les extraits intestinaux sont incubés avec CVB4, le 1^{er} filtrat ne possède pas d'activité anti-CVB4, tandis que le 2^{ime} filtrat obtenu après l'ajout du tampon de dissociation, possède une activité anti-CVB4 dont les titres sont inférieurs d'une dilution à ceux des extraits intestinaux (voir Fig 24-C).

Comme attendu, l'activité est retrouvée dans le filtrat obtenu suite à la dissociation des complexes formés à la faveur de l'incubation des extraits intestinaux avec CVB4.

Lorsque ces filtrats sont déposés dans un gel d'électrophorèse en condition dénaturante mais en l'absence de β-mercaptoéthanol une seule bande est visible avec un poids moléculaire évalué à 89 361 Da.



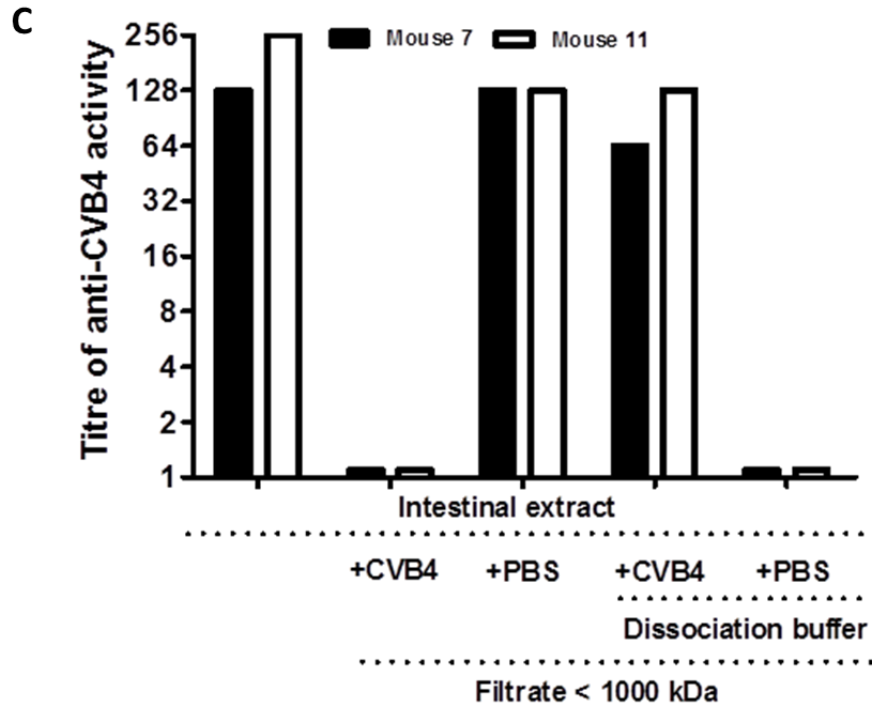


Fig.24 : Isolement de l'activité anti-CVB4E2 par formation de complexe avec le virus

L'extrait intestinal issu de 2 souris (S7 et S11) est préincubé avec du CVB4E2 ou du PBS avant d'être filtré sur une colonne 1000 kDa imperméable au virus (A). Le rétentat renfermant le complexe virus-principe actif est ensuite solubilisé dans un tampon avant d'être élué (B). Les différentes fractions éluées sont testées pour leur activité anti-CVB4E2 (C).

Lorsque ces filtrats sont déposés dans un gel d'électrophorèse en condition dénaturante et en présence de β -mercaptoéthanol deux bandes sont visibles, avec un poids moléculaire évalué pour l'une à 97 297 Da et pour la seconde à 83 695 Da. Le poids moléculaire (PM) des bandes est obtenu en appliquant cette équation de régression linéaire :

$$PM = 10^{(-0,0319X + 5,2861)}, \text{ avec } X \text{ correspondant à la distance de migration de la bande en mm.}$$

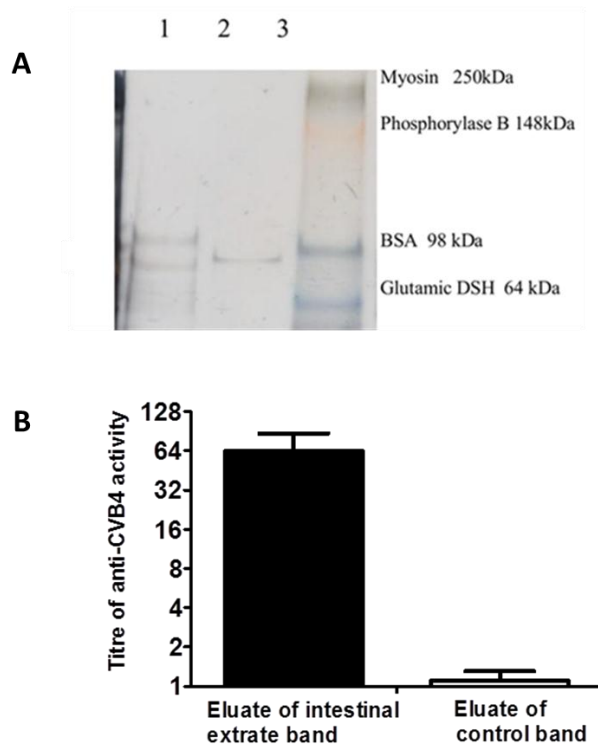


Fig 25 : Isolement du principe actif sur un gel SDS-PAGE

L'éluat contenant l'activité anti-CVB4E2 isolé par formation de complexe avec le virus a migré dans un gel d'électrophorèse SDS-PAGE en condition dénaturante avec (piste 1) ou sans β -mercaptoéthanol (piste 2). La bande d'intérêt en condition dénaturante sans β -mercaptoéthanol est identifiée à environ 89 kDa (**A**). La bande d'intérêt ainsi qu'une bande témoin sont éluées du gel et testées pour leur activité anti-CVB4E2 (**B**).

Après élution et test pour l'activité biologique, la bande à 89361 Da, obtenue en absence de β -mercaptoéthanol, possède une activité anti-CVB4 (Fig. 25-B) ; alors qu'aucune activité anti-CVB4 n'est retrouvé avec les bandes obtenues en présence de β -mercaptoéthanol (résultats non montré).

IV – DISCUSSION

IV.1 - Etude de l'infection à CVB4 *in vitro* des cellules non endocrines du pancréas humain (cellules ductales et lignée continue PANC-1)

Des études ont précédemment démontré que les cellules ductales du pancréas de l'adulte pouvaient se différencier en cellules endocrines (Bonner-Weir et al. 1993 ; Bonner-Weir et al. 2000 ; Kritzik et al. 2000). Les cellules ductales pancréatiques pourraient donc être considérées comme une source de cellules précurseurs impliquées dans le renouvellement des cellules β (Bonner-Weir et al.2001 ; Bonner-Weir et al. 2004). Le but de ce travail est d'étudier l'infection par CVB4 des cellules ductales humaines et ses conséquences sur le processus de différenciation. Il est à noter que les cultures primaires de cellules ductales humaines sont infectables par la souche diabétogénique CVB4E2, avec réplication virale. Cependant, l'étude de la persistance de l'infection et de son impact en particulier sur le processus de différenciation a été empêchée par une limitation technique. En effet, la viabilité cellulaire des cultures de cellules ductales primaire est réduite de façon significative à partir de J4 – J5 p.i, une durée relativement courte par rapport à la durée moyenne de 6 jours nécessaire pour l'obtention de structures de différenciation. Cette limitation technique nous a amené à poursuivre nos travaux en utilisant la lignée d'origine ductale PANC-1 comme modèle pour l'étude de l'infection persistante des cellules ductales et de ses effets.

Comme pour les cultures primaires de cellules ductales, la lignée PANC-1 est également infectable par CVB4E2, avec réplication virale. Cette infection est caractérisée par une phase aiguë durant la première semaine de suivi. Au-delà de la première semaine de suivi, la détection de la protéine de capsid virale VP1, ainsi que les brins d'ARN de polarité positive

et négative dans les extraits cellulaires et les surnageants de culture tout au long des 37 semaines de suivi prouve que la lignée PANC-1 est infectable par CVB4E2 de façon persistante. La crise aiguë avec une forte production virale des deux premières semaines, suivie d'une infection persistante est comparable aux études *in vitro* qui ont rapporté une infection persistante de cellules fœtales nerveuses par le poliovirus après une phase initiale de crise aiguë lytique (Pavio et al. 1996). Après cette phase initiale de production virale, la synthèse et la libération de particules virales dans le surnageant de culture sont restées modérées, fluctuant entre 10^3 et 10^5 TCID₅₀/mL durant le reste du suivi. Des cas d'infection persistante avec CVB4 dans les systèmes cellulaires humains ont déjà été rapportés dans la littérature : les ilots pancréatiques (Chehadeh et al. 2000), les cellules épithéliales thymiques (Brilot et al. 2002), ainsi que la lignée K1 issue d'un carcinome thymique (Desailloud et al. 2009). Dans ces études précitées et dans la nôtre, une infection persistante de type « état porteur » a été caractérisée. Une infection persistante de type « état porteur » a également été proposée dans d'autres études pour expliquer la persistance des CVB dans les cellules lymphoïdes humaines et les fibroblastes myocardiques (Heim et al. 1992 ; Matteucci et al. 1985 ; Pinkert et al. 2001).

La RT-PCR sans extraction est une technique qui permet la détection et la quantification d'ARNm cellulaires et d'ARN viral dans une seule cellule comme précédemment décrit (Huang et al. 2009 ; Surmeier et al. 1996 ; Wang et al. 2006). Cette technique, appliquée à un nombre limité de cellules, a permis de montrer que la proportion de cellules renfermant de l'ARN viral est beaucoup plus importante que ne laisse imaginer le nombre de cellules positive à la VP1 en IFI dans notre étude. Grâce à cette technique, il a été possible de montrer que l'ARN viral était présent dans au moins 50% des cellules de culture renfermant

entre 80 – 85% de cellules ductales. Notre étude apporte la confirmation que les cellules ductales pancréatiques humaines peuvent renfermer de l'ARN viral, ce qui est accord avec la détection précédemment rapportée d'ARN viral par hybridation *in situ* dans les cellules ductales pancréatiques de patients DT1 (Yilipaasto et al. 2004). La persistance d'un entérovirus, en l'occurrence CVB4, dans les cellules de la lignée d'origine ductale pancréatique PANC-1 dans notre étude suggère qu'une persistance / latence d'ARN entéroviral dans les cellules ductales *in vivo* ne peut être exclue, ce qui pourrait contribuer à la pathogenèse viro-induite ou l'aggravation du DT1.

Notre étude soulève la question cruciale de la persistance de l'ARN entérovirale dans les cellules ductales pancréatiques *in vivo*. La persistance de l'ARN entérovirale dans divers tissus et organes a déjà été rapportée (Fujioka et al. 2004 ; Satoh et al. 1994). La présence d'ARN entérovirale associée à un processus inflammatoire dans des biopsies intestinales successives est récemment rapportée chez des patients DT1, ce qui est en faveur d'une infection entérovirale prolongée ou persistante dans cet organe (Oikarinen et al. 2012). La persistance / latence de l'ARN des CVB peut être une source de stimulation du système immunitaire et pourrait être impliquée dans l'initiation et/ou la progression et l'aggravation de processus auto-immuns (Chapman et al. 2008).

Au niveau morphologique, les structures ressemblant aux îlots (ICAs) issues des tests de transformation des cellules PANC-1 contrôles sont similaire à celles décrites par Hardikar *et al.* (Hardikar et al. 2003). Ces mêmes structures issues de la transformation des PANC-1 chroniquement infectées par CVB4E2 sont moins homogènes, moins compactes, avec très peu de cellules viables comparées aux structures issues de la transformation des cellules contrôles. Ainsi, l'infection persistante a entraîné une perturbation de la formation, de la

stabilité morphologique et de la viabilité des ICAs. De plus, lorsque les ICAs issues de la transformation des cellules contrôles sont infectées par CVB4E2, des structures tridimensionnelles dissociées avec un nombre très important de cellules mortes sont observées dès le J2 p.i.. Ces résultats suggèrent que le processus de différenciation des cellules ductales en cellules endocrines, processus mimé dans cette expérience de formation des ICAs, peut être un événement clé, aboutissant à des structures désorganisées avec mort cellulaire en cas d'infection par CVB4E2.

Dans les cellules PANC-1 inoculées par CVB4E2, l'ARNm de Pdx-1 n'est pas détectable après 5 semaines de culture et jusqu'à la fin du suivi, à la différence des autres facteurs (IGF2, MxA et CK19). La détection négative de l'ARN de Pdx-1 dans notre système n'était liée à une sélection de cellules Pdx-1 négatives durant la phase aiguë de l'infection, auquel cas Pdx-1 serait resté indétectable après la phase de crise aiguë et ce, dès J9 p.i.. Il s'agit ici du premier rapport sur une modulation viro-induite de l'expression de Pdx-1 dans une lignée cellulaire issue de cellules ductales pancréatiques.

Dans notre modèle, Pdx-1 était détectable par RT-PCR, alors que les ARN de l'insuline et du glucagon n'étaient pas détectables, ce qui est en accord avec les résultats d'études précédentes qui ont montrées que la synthèse de ces hormones par ce modèle n'est obtenue qu'après stimulation des PANC-1 par 5'Azadeoxycytidine (AZA) ou par un peptide-1 similaire au glucagon (Lefebvre et al. 2010 ; Hui et al. 2001). Dans notre étude, les ARNm de l'insuline et du glucagon n'étaient pas détectables, même au niveau des cellules PANC-1 transformées en ICAs ; ce qui est en désaccord avec les données publiées par Hardikar *et al* qui ont décrit une production de ces hormones par ces cellules (Hardikar et al. 2003). La différence observée entre nos résultats et ceux d'Hardikar et al pourrait être expliquée par le fait que

les cellules de notre étude étaient plus âgées (passage 10 à 11) que celles utilisées Hardikar *et al* (passage 3 à 6).

Le mécanisme à l'origine de la perturbation de l'expression de Pdx-1 dans notre étude reste à être élucidé. Le récepteur tyrosine kinase c-Kit est exprimé à un niveau élevé dans les cellules PANC-1 (Githens *et al.* 1988). Dans les modèles d'inactivation du gène c-Kit médiée par siRNA, la réduction des taux de la protéine c-Kit dans les cellules PANC-1 a entraîné une réduction significative des taux d'ARNm de Pdx-1 (Wu *et al.* 2010). A ce propos, il est intéressant de noter que le virus de la maladie de Newcastle, de la famille des Paramyxoviridae, a entraîné une diminution de l'expression de c-Kit à travers l'activation du TLR3 (Orinska *et al.* 2005). Considérés ensemble, ces résultats suggèrent que la perturbation de l'expression de Pdx-1 dans notre système d'infection des PANC-1 par CVB4 pourrait être liée à une inhibition de c-Kit.

Pdx-1 caractérise le tissu dont la différenciation aboutit à la formation du pancréas durant l'organogenèse (Kritzik *et al.* 2009 ; Song *et al.* 1999). Les cellules endocrines pancréatiques peuvent être obtenues à partir de cellules ductales humaines et murines (cellules primaires et lignée continue) (Bonner-Weir *et al.* 2000 ; Gao *et al.* 2003 ; Hardikar *et al.* 2003). Dans la mesure où nos résultats démontrent que CVB4E2 peut infecter les cellules ductales humaines et de façon persistante la lignée PANC-1, avec une perturbation de la synthèse de Pdx-1 et du processus de différenciation à travers la formation des ICAs, nous supposons qu'une infection persistante des cellules ductales humaines par CVB4 pourrait perturber leur différenciation en cellules endocrines. Un tel effet de CVB4 peut être impliqué dans la pathophysiologie de l'infection, d'autant qu'il a été précédemment démontré qu'une perte ou une profonde perturbation de la néogenèse des îlots jouait un rôle essentiel dans la

déplétion des cellules β chez la souris infectée par CVB4E2 (Yap et al. 2003). Une perturbation de la différenciation cellulaire induite par un CVB a récemment été rapportée dans un autre système ; en effet, l'infection des cellules progénitrices neurales et des cellules souches chez la souris par CVB3 a abouti à une altération de leur différenciation (Tsueng et al. 2011).

La RT-PCR appliquée à un nombre limité de cellules (autour de 1 et 10 cellules) a permis de montrer que la proportion de cellules PANC-1 renfermant l'ARN de CVB4E2 est beaucoup plus importante que ne le laissait imaginer le nombre relativement faible de cellules positives à la VP1 par IFI. Le nombre élevé de cellules contenant l'ARN viral est en accord avec l'ampleur des conséquences morphologiques et moléculaires liées à l'infection chronique des PANC-1. La proportion de cellules avec de l'ARN viral répliquatif demeure difficile à apprécier. En considérant le temps nécessaire à l'élimination de l'ARN viral des cultures de cellules PANC-1 (4 mois ou 16 passages), il est probable qu'une large proportion de cellules renferme de l'ARN viral latent réactivable à tout moment dans certaines cellules, avec une cytolysse résultant d'une production de virions. D'autres expériences sont nécessaires pour explorer cette hypothèse.

Le DT1 est considéré comme une résultante de la destruction ou de l'altération du fonctionnement des cellules β (Eizirik et al. 2009). Plusieurs études ont montré que les infections entérovirales, particulièrement ceux dues au CVB, étaient associées à la maladie (Yeung, Bmj 2011). Que les entérovirus puissent initier ou accélérer la maladie est un sujet de controverse. Plusieurs mécanismes pourraient jouer un rôle dans l'induction ou l'accélération de la maladie par les entérovirus (Sane et al. 2011 ; Hober and Sauter 2010). Cette présente étude a démontré que les cultures primaires de cellules ductales peuvent

être infectées par CVB4E2 *in vitro*, ce qui est en accord avec la présence d'ARN entéroviral dans les cellules ductales humaines observée *in vivo* par Yilipaasto *et al* (Yilipaasto et al. 2004) et suggère qu'une infection persistante de ces cellules avec altération du processus de différenciation en cellules endocrines ne peut être exclue. En outre, il ne peut être écarté que le pool de cellules endocrines puisse être réduit quand les cellules ductales en cours de différenciation sont exposées aux effets cytolytiques des infections entérovirales. Par ailleurs, les cellules ductales pourraient être un site de persistance des entérovirus, ce qui permettrait à ces virus de se propager aux cellules β environnantes.

L'infection des cellules ductales humaines par les entérovirus, avec leurs effets dommageables, pourrait jouer un rôle *in vivo* dans la pathogenèse du DT1. La présence de l'ARN entéroviral dans les cellules ductales pancréatiques de patients mérite d'autres investigations.

IV.2 - Coxsackievirus B4 peut infecter in vitro des fragments de pancréas de rat à différents âges de la vie

Le rôle joué par les virus dans la pathogenèse du DT1 a beaucoup été étudié in vivo chez la souris NOD, avec cependant deux résultats contraires selon que l'infection survient chez une souris avec ou non un processus auto-immun en cours. L'infection par CVB de souris NOD jeunes, sans processus auto-immuns en cours, aboutit à un effet protecteur vis-à-vis du DT1 ; alors que l'infection d'animaux âgés, avec processus auto-immun déjà enclenché, se traduit par une accélération et une aggravation de la maladie (Serreze et al. 2000). Ce DT1 CVB-induit chez la souris NOD s'accompagne aussi d'une pancréatite du tissu exocrine (Horwitz et al. 1999), ce qui la différencie de la maladie chez l'homme et constitue, en plus de sa petite taille, une limite importante au choix de la souris NOD comme modèle.

Le rat par contre pourrait constituer un modèle intéressant pour l'étude de la pathogenèse viro-induite du DT1. En effet son envergure par rapport à la souris rendrait les expérimentations in vivo et l'accès aux organes cibles plus faciles. Cependant même si c'est chez le rat que le premier modèle de diabète spontané (rat BBDP) a été mis au point, un modèle rat sensible à l'infection par le CVB4, virus associé à la pathogenèse du DT1, n'est pas encore caractérisé, d'où la raison de ce travail. Nous avons inoculé du CVB4 à des fragments de pancréas prélevés chez des embryons rats Wistar âgés de 21 jours de gestation et de rats âgés de 7, 21, 40 jours et 8 mois. Nos résultats montrent que les cultures organotypiques de fragments de pancréas de rat sont infectables par CVB4 et cette infection s'est traduite par une réplication virale, quel que soit l'âge de l'animal. L'infection de lignée pancréatique (RINm5F) de rat par CVB4E2 a déjà été réalisée in vitro (Berg et al. 2005).

Cependant c'est la première fois, à notre connaissance, qu'une infection in vitro de cultures primaires de tissus pancréatiques de rat par CVB4 est documentée.

Le choix de la souche de rat Wistar pour cette étude se justifie par le fait c'est la souche qui a donné par croisement le premier modèle animal de diabète spontané (rat BBDP). Cette souche revêt d'autant plus d'intérêt qu'elle semble mieux adaptée pour la compréhension des interactions entre facteurs environnementaux dont les virus et le DT1 (Bortell and Yang 2012). Une infection d'un autre modèle de rat pour le DT1, la souche LEW.1WR1, par différents virus dont CVB4E2 a précédemment été constatée. Cependant contrairement à l'infection par les virus de rat KRV (Kilham rat Virus) et le RCMV (rat Cytomegalovirus) qui induit chez cette souche un déclenchement de diabète avec un taux de pénétrance supérieur à 60%, l'infection par CVB4E2 n'induit aucun diabète. Le CVB4E2 n'induit un diabète, avec d'ailleurs un taux de pénétrance relativement faible (17%), chez la souche LEW.1WR1 que si les rats sont prétraités avec du poly I:C, un activateur de l'immunité innée (Tirabassi et al. 2010). Ces différentes données montrent que la souche LEW.1WR1 semble moins adaptée comme modèle pour l'étude des interactions DT1 CVB4.

L'infection in vivo des cultures primaires de tissus pancréatiques issus de rats d'âges différents n'a pas permis de mettre en évidence une différence de sensibilité à l'infection selon l'âge de l'animal. Nous n'avons pas non plus observé d'ECP ou une altération quelconque des cultures de fragments pancréatique. Un résultat contraire a par contre été mis en évidence chez la souris où des expérimentations ont montré que les cultures primaires de cellules nerveuses ou pulmonaires étaient plus sensibles à l'infection par les CVB que les cultures de cellules issues d'animaux adultes ; l'évaluation de la sensibilité à l'infection était basée sur le pourcentage d'ECP, la quantification par PCR de l'ARN viral

intracellulaire et la quantification de l'expression de la protéine de capsid virale VP1 par IFI. Cette différence de sensibilité s'expliquant par le récepteur aux entérovirus CAR qui est moins exprimé sur les cellules de souris adultes (Ahn et al. 2008 ; Sun et al. 2012).

Cependant une information importante à retenir, révélée par la recherche de la protéine de capsid virale VP1 par IFI, est que CVB4 infecte principalement les ilots de Langerhans. Cette localisation de la protéine de capsid virale VP1 est partiellement différente de celle décrite lors de l'infection *in vivo* par les CVB de souris Swiss ICR. En effet, la protéine VP1 est localisée chez cette souris ICR aussi bien au niveau du pancréas endocrine que dans le tissu exocrine, que le virus soit administré par voie orale ou par voie intra-péritonéale (Bopegamage et al. 2005). D'autres auteurs ont quant à eux montré, toujours chez la souris (C57BL/6), que l'infection *in vivo* par les CVB était préférentiellement localisée au niveau du pancréas exocrine (Vella et al. 1991 ; Arola et al. 1995 ; Mena et al. 2000).

L'infection *in vitro* de tissus de rats Wistar par CVB4E2 et la localisation préférentielle du virus dans le tissu endocrine sont encourageantes pour une étude *in vivo* de l'infection de cette souche de rat. Le modèle rat pourrait s'avérer une alternative intéressante à la souris si de futures expérimentations d'infection *in vivo* par les CVB confirmaient la localisation du virus observée *in vitro* et cela ferait du rat un modèle plus proche de l'homme concernant l'atteinte des tissus.

IV.3 - Le lait humain peut neutraliser coxsackievirus B4 in vitro

Les infections entérovirales sont fréquentes dans l'enfance. Le rôle des entérovirus en générale et des CVB en particulier est fortement suspecté. L'absence d'allaitement maternel est associée à un risque plus élevé de développer le DT1 (Malcova et al. 2006). Le mécanisme de cet effet protecteur du lait maternel n'est pas encore élucidé. Notre hypothèse est que cet effet protecteur du lait maternel serait lié à une activité neutralisante de ce milieu biologique vis-à-vis des entérovirus qui sont susceptible de jouer un rôle dans la pathogenèse du DT1, surtout à cet âge critique. Il y'a 6 CVB et beaucoup d'autres sérotypes au sein l'espère HEB. Nous avons cependant décidé d'axer notre étude sur CVB4, un des représentants du genre Entérovirus considéré comme model et dont l'implication est fortement suspectée dans la pathogenèse du DT1 (Jaidane et al. 2008).

Il y'a plusieurs considérations remarquables relatives aux méthodes utilisées dans la présente étude. La séparation des fractions aqueuse et crémeuse a permis l'étude de l'activité antivirale du lait maternel. Le lait maternel est cytotoxique et cette cytotoxicité est surtout due à la fraction crémeuse comme précédemment rapporté (Sakaguchi et al. 1995). La centrifugation du lait a permis de séparer la fraction crémeuse de celle aqueuse qui, elle, est en mesure de neutraliser CVB4. Ce qui est en accord avec les résultats d'études précédentes qui on montrées que l'activité liée à une exposition antérieure aux agents infectieux était préférentiellement retrouvée dans la fraction aqueuse du lait maternel (Herrera-Insua et al. 2001).

Pour la première fois, à notre connaissance, l'activité neutralisante anti-CVB4 du lait maternel est mise en évidence en utilisant une méthode biologique qui reflète mieux sa

capacité protectrice que les titrages d'anticorps par les méthodes immunologiques, qui, elles, ne reflètent pas nécessairement la capacité neutralisante des fluides biologique vis-à-vis d'agents infectieux (Asensi et al. 2006). Notre étude démontre clairement que le lait maternel est capable de neutralise CVB4, alors que dans les études antérieures les titres anticorps anti-entérovirus ont été déterminés par des techniques immunologiques. Dans plusieurs études, les titres d'anticorps du sérum et du lait maternel ont été déterminés par la méthode d'immunodiffusion radial de Mancini (Araujo et al. 2005) ou par des systèmes immuno-enzymatiques en phase solide utilisant comme antigène un entérovirus purifié (CVB4, échovirus 11) et un peptide antigénique synthétisé à partir de la séquence de la protéine de capsid virale VP1, un épitope commun à la plupart des entérovirus (Sadeharju et al. 2007; Cello et al. 1994; Lönnrot et al. 2000).

Nos travaux démontrent clairement pour la première fois que le lait maternel, à travers sa fraction aqueuse, peut neutraliser CVB4. Cependant, d'importantes variations entre individus sont observées, les titres d'activité allant de moins de 2 à 1024 pour les échantillons testés avant congélation. Les titres d'activité neutralisante anti-CVB4 sont supérieurs ou égaux à 128 chez l'ensemble des 15 colostrums congelés du Congo (100%), contre seulement 9 des 49 (18,3%) colostrums congelés de Lille. Cette différence significative de titre d'activité entre les échantillons des deux régions pourrait s'expliquer par l'environnement et les conditions de vie, avec d'une part, des standards d'hygiène moins élevés dans les pays en développement où les infections entérovirales sont plus fréquentes (Bessaud et al. 2012). Les titres d'activité anti-CVB4 des colostrums du Congo sont probablement sous-estimés. En effet, il est observé dans nos expériences que les titres des

échantillons de colostrum congelés de Lille étaient diminués comparés à ceux des mêmes échantillons testés avant congélation (282+/-155 contre 50 +/-60 respectivement P = 0.010).

Nos résultats mettent en évidence des variations individuelles de l'activité anti-CVB4, ce qui pourrait être lié à l'exposition aux entérovirus. En plus des variations interindividuelles, des variations intra-individuelles de l'activité anti-CVB4 sont également observées chez les donneuses ayant fait l'objet de prélèvements successifs aussi bien Lille qu'au Congo. Ce qui est en accord avec la composition du lait maternel qui change entre la fin de la première semaine (colostrum) et la deuxième semaine (lait de transition). En effet, il y'a une diminution significative de la teneur en protéines et en immunoglobulines, et une augmentation de celle du lactose et d'acides gras (Araujo et al. 2005). Considérés globalement, nos résultats suggèrent que le lait maternel de certaines femmes pourrait avoir une très faible activité anti-CVB4, ce qui pourrait exposer le nouveau-né à un risque d'infection avec un virus hautement suspecté dans la pathogenèse du DT1.

L'incubation de la fraction aqueuse du colostrum avec les billes d'agarose enrobées de jacaline a entraîné une diminution significative (P < 0,001) du titre neutralisant d'activité anti-CVB4. Ce résultat suggère que les sIgA jouent un rôle important dans cette activité anti-CVB4 du lait maternel in vitro, d'autant plus que la jacaline est un inhibiteur spécifique de l'isotype sIgA (Roque-Barreira et al. 1985; Kondoh et al. 1986). La jacaline ne lie pas l'isotype sIgA2 ; par conséquent, il n'est pas exclu que les sIgA2 soient responsables de l'activité résiduelle observée après incubation de la fraction aqueuse du colostrum avec la jacaline dans notre étude (Kondoh et al. 1987).

Ces résultats montrent que les sIgA pourraient jouer un rôle dans la protection du jeune enfant contre les infections à CVB4. Ceci est en accord avec le rôle des immunoglobulines qui, avec la lactoferrine, sont considérées comme responsables de l'activité antimicrobienne du lait maternel (Hanson et al. 1994; Raptopoulou-Gigi et al. 1977). Nos résultats suggèrent que l'allaitement maternel pourrait protéger le nouveau-né contre les infections à CVB4 grâce à la présence d'immunoglobulines neutralisantes, ce qui tend à confirmer une hypothèse récemment émise qui stipulait que l'effet protecteur du lait maternel vis-à-vis du risque d'infection entérovirale serait dû à la présence d'anticorps neutralisants (Sadeharju et al. 2007).

Il a été observé que l'activité anti-CVB4 était réduite lorsque les échantillons étaient préalablement congelés, ce qui suggère que l'activité biologique des sIgA pourrait être altérée dans ces conditions, même si la concentration de ces sIgA reste inchangée comme précédemment démontré après une congélation de 6 mois à -20°C et à -80°C (Ramirez-Santana et al. 2012). D'autre part, nos résultats ont aussi révélé que la pasteurisation (63°C, 30mn) altérait de façon significative l'activité anti-CVB4 (10 +/-26 contre 255 +/-305 P < 0.0001). Considérés ensemble, ces résultats suggèrent que les processus de traitement des dons de lait au sein des lactariums devraient être revus afin de préserver leur activité antivirale. Le traitement du lait maternel et ses conséquences sur les effets bénéfiques antimicrobiens n'est pas sans rappeler d'autres études qui se sont interrogées sur la question (Raptopoulou-Gigi et al. 1977; Bjorksten et al. 1980).

Nos résultats montrent que le lait maternel, en particulier le colostrum, peut avoir une activité anti-CVB4 *in vitro* qui dépend des sIgA. Nous supportons que l'allaitement maternel, par le biais de l'activité neutralisante anti-entérovirus du lait peut aboutir à une protection

de l'enfant vis-à-vis d'infections de virus dont l'implication dans la pathogenèse du DT1 est fortement suspectée.

IV.4 – Effet du lait humain sur l'incidence du diabète de type 1 et sur la flore commensale intestinale chez la souris NOD

Le lait maternel humain qui joue un rôle important dans la modulation de la flore microbienne chez le nouveau-né et l'enfant est considéré comme un facteur de prévention du DT1 (Harmsen et al. 2000). Des travaux ont même permis d'établir un lien entre l'absence d'allaitement maternel et le risque de développement du DT1 (Malcova et al. 2006 ; Alves et al. 2012). Cependant les mécanismes expliquant ce rôle modulateur du lait maternel sur l'incidence du DT1 restent encore à élucider. Le but de nos travaux était d'explorer l'effet du lait maternel dans le diabète de type 1 *in vivo*. Nous avons réalisé cette étude dans le modèle de la souris NOD.

Une information essentielle à retenir de cette étude est que l'incidence du DT1 est significativement réduite dans le groupe de souris femelles NOD ayant accès au lait maternel humain, comparativement à celle observée dans le groupe de souris contrôle ayant uniquement accès à l'eau. Le lien éventuel entre le lait maternel et le DT1 a précédemment été analysé chez l'homme dans études épidémiologiques (Meloni et al. 1997; Hummel et al. 2000 ; Malcova et al. 2006 ; Alves et al. 2012), mais c'est la première fois, à notre connaissance, qu'une étude prospective chez la souris NOD est menée afin d'analyser ce lien et les mécanismes mis en jeu. Afin de comprendre ces mécanismes, des groupes bactériens de la flore microbienne tels que les bifidobactéries, les entérobactéries, les entérocoques et certaines bactéries anaérobies ont été dénombrées et analysées.

Le lait maternel humain renferme en particulier d'importantes quantités de bifidobactéries (Martinez et al. 2009), un important groupe bactérien de la flore microbienne, capable de

réduire de façon significative le risque d'infections et de maladies allergiques (Kalliomaki et al. 1999 ; Kalliomaki et al. 2001 ; Oddy et al. 1999).

Considérant de façon globale tous les groupes bactériens analysés, un effet chronobiologique très significatif ($p < 0,0001$), avec des variations sigmoïdiennes, est observé dans toutes les populations bactériennes. En particulier, le lait humain influence au cours du temps la croissance des bifidobactéries, lactobacillus, *A. viridans* and *E. coli*, mais ne supprime pas la cinétique sigmoïdienne. Ces résultats suggèrent que les substrats de l'hôte ne sont pas fournis de façon continue et avec une composition constante à la flore microbienne. De toutes les populations bactériennes analysées, seuls deux groupes bactériens sont associés au déclenchement du diabète : *Enterorhabdus* et *A. viridans*. Les populations d'*Enterorhabdus* sont significativement plus importantes chez les souris NOD non diabétiques quel que soit le régime alimentaire considéré. Ainsi deux marqueurs bactériens potentiellement impliqués dans la survenue du diabète de type 1 chez la souris NOD ont été identifiés : *Enterorhabdus* en tant que marqueur potentiellement bénéfique et insensible à la prise de lait, *A. viridans* en tant que marqueur potentiellement délétère mais sensible à la prise de lait. Quoi qu'il en soit, les variations des populations bactériennes semblent protéger du développement du DT1. Cette observation rejoint celle faite par Wen *et al.* sur le rôle de la flore microbienne intestinale dans le développement du DT1 chez les souris NOD MyD88-déficient, un autre modèle murin de DT1 (Wen et al. 2008). Les auteurs démontrent dans cette étude que presque tous les animaux sans flore microbienne développent un DT1, alors que l'incidence du DT1 est significativement diminuée lorsqu'on leur implantait une flore murine.

En l'absence d'autres facteurs, en particulier de flore microbienne intestinale entièrement caractérisée, le patrimoine génétique de la souris NOD reste un important facteur contribuant au développement naturel du DT1. Cependant il est bien établi que ce développement de la maladie est modulé par le régime alimentaire (Elliott et al. 1988 ; Mueller et al. 2009) et les interactions entre ce dernier, le système immunitaire et la flore microbienne.

Le lait humain dans notre étude a réduit l'incidence du DT1 chez la souris NOD. Les 3 animaux qui ont cependant déclarés la maladie ont eu des symptômes (hyperglycémie) avant 20 semaines. Chez les souris n'ayant pas accès au lait humain, le diabète survient plus tard mais la proportion de sujets dans ce cas n'est pas statistiquement plus grande que dans l'autre groupe. Le lait humain à la faveur d'interactions avec la flore microbienne et le système immunitaire empêche l'évolution de la maladie chez certains animaux mais pas chez d'autres.

Il apparaît cependant à travers les données disponibles que cet effet protecteur du lait ne serait pas la résultante de l'action d'un seul élément, mais plutôt la finalité d'interactions entre plusieurs facteurs dont les prébiotiques tels que les oligosaccharides (Coppa et al. 2006). Les prébiotiques sont des oligosaccharides ou polysaccharides constitués d'unités de sucres échappant à la digestion par les enzymes de l'intestin grêle et qui constituent un substrat pour la fermentation par les bifidobactéries et les lactobacilles. Le lait humain, à travers ses apports en prébiotiques, va non seulement contribuer à modifier la perméabilité du mucus intestinal directement par la libération de facteurs bioactives ou indirectement par activation de cellules immunitaires (Bode et al. 2012), mais aussi moduler la composition de la flore microbienne locale. Un rôle des probiotiques dans cet effet protecteur du lait

humain est également envisageable. Il s'agit de micro-organismes vivants (bactéries, levures) habituellement contenus dans le lait et considérés comme ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Martin et al. 2009). Cette action du lait humain sur la flore va avoir des effets immuno-modulateurs directs suite à la stimulation des récepteurs spécifiques d'antigènes bactériens exprimés sur les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes T régulateurs (Coombes et al. 2008 ; Vaarala et al. 2011).

L'augmentation constante de l'incidence du DT1 surtout dans les pays développés durant ces dernières décennies suggère une influence des modifications de l'environnement, y compris de la flore microbienne, dans la pathogenèse de la maladie. L'incidence du DT1 spontané chez la souris NOD peut être modulée par l'exposition à des stimuli d'origine microbienne tels que l'injection de produits bactériens divers (Pozzilli et al. 1993) ou l'environnement microbien du lieu d'élevage (Sadelain et al. 1990 ; McInerney et al. 1991). Notre étude a mis en évidence une influence du lait humain et de la flore microbienne intestinale sur l'incidence du DT1 chez la souris NOD. Cependant des travaux complémentaires sont nécessaires pour élucider les mécanismes protecteurs du lait maternel vis-vis du DT1 chez la souris NOD.

IV.5 - L'extrait intestinal murin peut neutraliser coxsackievirus B4 in vitro

La difficulté à concevoir des molécules chimiques à visée thérapeutique pour la prise en charge de pathologies virales en particulier justifie aujourd'hui l'intérêt croissant accordé à l'identification et à la caractérisation de molécules naturelles. Des molécules à activité inhibitrice non spécifique ont déjà été caractérisées, mais elles présentent moins d'intérêt du fait de leur spectre antiviral très limité (Karzon et al. 1956 ; Kitamura et al. 1973). Une attention croissante est à présent accordée à l'identification et à la caractérisation de molécules naturelles à activité antivirale à large spectre (Kumar et al. 1984 ; Baron et al. 1986 ; Singh et al. 1999) ou à activité spécifique vis-à-vis d'une famille de virus à l'origine de problème de santé publique. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail relatif à la recherche et la caractérisation dans le milieu intestinal de souris de molécules à activité anti-CVB4, un virus dont l'implication dans la pathogenèse du DT1 est fortement suspectée.

Ces inhibiteurs viraux font partie du système immunitaire inné et jouent un rôle important dans la clearance virale précoce intervenant avant même la mise en route du système immunitaire adaptatif (Baron et al. 1963).

Notre étude a montré que l'extrait intestinal murin renferme une molécule capable d'inhiber l'ECP induit par le CVB4E2 sur les cellules Hep-2. Cette activité antivirale, découverte à l'aide d'un test biologique, est variable selon les individus murins (les valeurs des titres s'étalent de 8 à 512, n = 11). Cette activité antivirale a un mécanisme d'action qui se caractérise par une action directe sur le virus avant l'infection des cellules. La molécule support de cette activité a un poids moléculaire estimé à 89 kDa. Les différences de titre d'activité observées avant et

après l'étape d'élution pourraient s'expliquer par une élution incomplète ou une altération partielle de l'activité par le tampon d'élution.

Le test appliqué dans notre étude a permis la mise en évidence d'une activité antivirale dans un milieu biologique à travers l'inhibition de l'ECP. Des techniques comparables ont été appliquées dans d'autres études (Baron and McKerlie 1981 ; Singh et al. 2001) pour la mise en évidence et la caractérisation de peptides antiviraux à large spectre.

Le mécanisme d'action retrouvé dans notre étude qui se manifeste par une action sur CVB4E2 avant que ce dernier n'entre en contact avec les cellules est comparable à celui d'autres inhibiteurs caractérisés dans l'intestin de souris qui agissent en inhibant l'attachement du virus aux cellules (Baron et al. 1986 ; Singh et al. 2001). Ce mécanisme d'action est par contre différent de celui de la neuramide et de celui caractérisé dans le mucus porcin qui agissent respectivement durant les phases précoces et tardives de la réplication viral, donc après l'entrée du virus dans la cellule (Singh et al. 2001). Des peptides à activité antivirale sont identifiés chez différentes espèce animales allant de l'homme à la souris en passant par le porc et ils sont essentiellement retrouvés dans le plasma, les fluides extracellulaires du tractus gastro-intestinal et dans certains tissus en particulier nerveux (Singh et al. 1992 ; Baron et al. 1998 ; Singh et al. 2001).

Les titres d'activité antivirale retrouvés dans notre étude (8 - 512) sont comparables à ceux de peptides antiviraux caractérisés dans le plasma (4 - 155), le système nerveux (36 - 288) ou le milieu gastro-intestinal (24 - 2162) (Shortridge and Ho 1974 ; Gueant et al. 1990 ; Engfer et al. 2000 ; Singh et al. 2001), avec des poids moléculaires allant de 0,6 à 4000 kDa. Le poids moléculaire du principe actif dans notre étude, estimé 89 kDa, est différent de celui

de peptides précédemment caractérisés dans cet environnement gastro-intestinal, dont le PM est estimé à 600 +/- 400 Da (Singh et al. 2001), mais comparable à celui de l'UTI-beta (60 à 90 kDa), une glycoprotéine sérique à large spectre antiviral, active notamment contre diverses familles de virus comprenant en particulier les enteroviruses (Singh et al. 1992).

Dans notre étude, l'échantillon d'extrait intestinal de souris est actif sur CVB4E2, CVB3 et poliovirus, des virus appartenant au genre entérovirus. Une activité vis-à-vis de virus appartenant au même genre entérovirus a été retrouvée par d'autres auteurs sur une glycoprotéine naturelle du sérum humain, l'UTI-béta (Singh et al. 1992). La méthode de préparation de l'extrait intestinal par trempage d'émincés de l'organe dans du PBS pourrait faire penser à une contamination par des molécules d'origine sanguine. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que des molécules à activité antivirale ont été retrouvées dans le sérum de mammifères (Singh et al. 1992). Cependant les tests réalisés avec le sérum prélevé chez les mêmes animaux n'ont pas mis en évidence une telle activité antivirale et confortent l'idée que cette activité est liée à l'environnement intestinal.

Par contre aucune activité n'est retrouvée vis-à-vis du virus EMCv, un cardiavirus, contrairement à Singh *et al.* (Singh et al. 2001) qui ont mis en évidence une activité du mucus intestinal de souris vis-à-vis du mengovirus, un cardiavirus considéré comme une souche d'EMCv. Cette différence d'activité pourrait s'expliquer par le fait que nous soyons face à deux molécules différentes, avec pour conséquence des spectres antiviraux différents. Ces deux molécules s'avèrent déjà différentes de par leur poids moléculaire estimé (89 kDa contre 0,6 +/- 0,4 kDa). Dans l'état actuel de nos tests, notre échantillon n'est actif que contre des virus appartenant tous au genre entérovirus. Il a déjà été rapporté l'existence de molécules naturelles, partiellement ou entièrement caractérisées, dont l'activité antivirale

n'est dirigée que contre un seul virus (Thiry et al. 1978; Gerna et al. 1980), un genre ou une famille de virus (Shortridge and Ho 1974; Welsh et al. 1976). Ces différences de spectre se caractérisant par des mécanismes d'action variés.

Nous retrouvons une activité biologique avec l'éluat de la bande (89,361 kDa) obtenue en conditions dénaturantes (SDS + chaleur) sans β -mercaptoéthanol. L'activité biologique n'est pas retrouvée en cas de traitement de l'échantillon avec la β -mercaptoéthanol. Ce constat suggère que la molécule d'intérêt comporte des ponts disulfures qui ne sont pas altérés par le traitement SDS + chaleur et qui sont nécessaires à son activité biologique. D'autre part, il est bien admis que la séquence en acides aminés d'une chaîne polypeptidique contient l'information nécessaire à sa conformation native qui va déterminer son activité biologique. Cependant, la dénaturation des protéines n'est pas toujours irréversible : le repliement de la protéine, certes très rare, peut restaurer une activité biologique, comme l'ont rapporté certains auteurs (Anfinsen et al. 1961) à propos de la ribonucléase A (RNase) bovine qui retrouvait son activité biologique après un traitement chimique dénaturant.

Ces molécules sont naturellement présentes dans différentes espèces de mammifères dans les tissus ou fluides corporels et sont potentiellement intéressantes pour des applications médicales. L'isolement et la caractérisation de ces facteurs protecteurs intrinsèques permettront de développer de nouvelles approches préventives en particulier vis-à-vis de virus tel que CVB4 dont le rôle dans la pathogenèse du DT1 est sérieusement envisagé. Cette approche préventive pourrait se décliner sous forme de complément alimentaire à visée pédiatrique.

V – CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogenèse viro-induite du DT1, nos travaux ont permis de montrer que les cellules primitives ductales humaines, ainsi que les cellules de la lignée PANC-1, à travers la production de particules virales et la détection de protéines et d'ARN viral intracellulaires, sont infectables par CVB4. Une infection persistante des cellules PANC-1 a été obtenue, avec présence de protéine virale VP1 (IFI) dans moins d'1% des cellules seulement mais détection d'ARN viral dans davantage de cellules (>50%). Une persistance de type « état porteur » a été mise en évidence après élimination du virus des cultures à l'aide d'immun-sérum anti-CB4 neutralisant. Il a été observé que CVB4 altérait la synthèse du marqueur de différenciation PDX-1 (ARNm détecté par RT-PCR) dans les cellules PANC-1 ainsi que leur différenciation en structure ressemblant à des îlots (Islet-like cell Aggregates).

L'étude des cultures organotypiques de pancréas de rats a révélé que la viabilité tissulaire était en moyenne de 7 jours. Les cultures de fragments de pancréas étaient infectables par CVB4 et l'évaluation par RT-PCR quantitative des titres viraux a montré que la réplication virale était relativement identique dans les cultures d'organes provenant de rats âgés (8 mois), ou d'animaux plus jeunes (1 semaine et 40 jours), et de fœtus (21 jours de gestation). L'examen immunohistochimique (VP1) des coupes d'organes a montré que l'infection était préférentiellement localisée au niveau des îlots de Langerhans.

Dans le cadre de l'identification et de la caractérisation des moyens de prévention contre les infections virales jouant un rôle causale ou aggravant dans le DT1, l'exploration du milieu

intestinal de souris a abouti à la mise en évidence et à la caractérisation d'un inhibiteur antiviral actif vis-à-vis du CVB4, CVB3 et du poliovirus. L'activité antivirale de cet inhibiteur, découverte à l'aide d'un test biologique, est variable selon les individus murins. Son mécanisme d'action est caractérisé par une action directe sur le virus avant l'infection des cellules. Cet inhibiteur, d'un poids moléculaire estimé à 89 kDa, n'a pas d'activité vis-à-vis du virus EMCV.

Une activité anti-CVB4 a été mise en évidence dans le lait maternel et le sérum. Cette activité a été retrouvée dans la fraction aqueuse du lait et elle est significativement plus importante dans le colostrum par rapport au lait de transition ($p < 0,05$) ou au lait mature ($p < 0,05$). Une variation interindividuelle a été constatée avec un titre neutralisant du lait faible ou nul chez des donneuses. Par ailleurs, il a été constaté que les titres sont significativement ($p < 0,0001$) plus élevés dans une zone du globe à forte prévalence entérovirale (République du Congo). Il n'y avait pas de corrélation entre les titres d'activité anti-CVB4 du lait et du sérum. La déplétion en IgA à l'aide de jacaline démontrait que l'effet neutralisant anti-CVB4 du lait était lié à cet isotype d'immunoglobulines.

La prise de lait humain par les souris NOD a conduit à une diminution significative ($p < 0,001$) de l'incidence du DT1 dans ce modèle. Des modifications notables de la flore microbienne intestinale ont été relevées, avec des variations sigmoïdiennes au cours du suivi des différentes populations bactériennes étudiées. En particulier, deux marqueurs bactériens potentiellement impliqués dans la survenue du diabète de type 1 chez la souris NOD ont été identifiés : *Enterorhabdus* en tant que marqueur potentiellement bénéfique et insensible à la prise de lait, *A. viridans* en tant que marqueur potentiellement délétère mais sensible à la prise de lait.

VI – RETOMBÉES ET PERSPECTIVES

Nos travaux concernant l'infection à CVB4 des cellules ductales humaines et ses conséquences permettent d'argumenter une nouvelle hypothèse concernant la pathogenèse viro-induite du DT1. La présence d'ARN entéroviral dans les cellules ductales humaines a été rapportée, suggérant qu'une infection persistante de ces cellules puisse induire une réduction du pool de cellules souches ou que cette persistance puisse constituer un site de propagation du virus aux cellules β environnantes. Par conséquent, cette présence de l'ARN entéroviral dans les cellules ductales pancréatiques de patients mérite d'autres investigations. D'autre part une élucidation du mécanisme à l'origine de la perturbation de l'expression de Pdx-1 devrait permettre une meilleure compréhension des effets de cette persistance virale dans les cellules ductales pancréatiques.

Le modèle de culture organotypique de rat permettra de mieux connaître l'infection du pancréas par CVB4. Une cartographie de l'infection *in vitro* avec une co-localisation protéines virales-marqueurs de cellules pancréatiques, suivie d'une infection *in vivo* permettront une meilleure évaluation du modèle.

L'isolement d'inhibiteurs antiviraux dans le milieu intestinal murin devrait permettre d'envisager de nouvelles approches préventives vis-à-vis des virus concernés. Afin de mieux cerner son spectre d'activité, l'effet de cet inhibiteur devra être évalué sur d'autres virus. Une utilisation de techniques de protéomiques est en cours pour une identification complète de cet inhibiteur.

L'activité inhibitrice du virus mise en évidence dans le lait, suggère que l'allaitement est un moyen de lutter contre l'infection par voie digestive des nouveau-nés et de limiter ainsi le

risque de développer un DT1 chez les enfants. L'absence d'activité neutralisante anti-CVB4 dans les fractions aqueuses du lait maternisé, ainsi que les titres faibles retrouvés dans les échantillons de certaines donneuses plaident pour une réflexion sur la supplémentation des lait maternisés en facteurs capables de protéger les enfants contre les infections entérovirales en général et à CVB4 en particulier.

L'identification /caractérisation de marqueurs prédictifs du déclenchement du DT1 devrait permettre de comprendre les mécanismes de la protection contre le diabète conférée par le lait humain chez la souris NOD.

Références

- Ahn, J., Y. Jee, I. Seo, S. Y. Yoon, D. Kim, Y. K. Kim, and H. Lee. 2008. Primary neurons become less susceptible to coxsackievirus B5 following maturation: the correlation with the decreased level of CAR expression on cell surface. *J Med Virol* 80 (3):434-440.
- Alves, J. G., J. N. Figueiroa, J. Meneses, and G. V. Alves. 2012. Breastfeeding protects against type 1 diabetes mellitus: a case-sibling study. *Breastfeed Med* 7 (1):25-28.
- Anfinsen, C. B., E. Haber, M. Sela, and F. H. White, Jr. 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47:1309-1314.
- Araujo, E. D., S. B. Carbonare, M. C. de Araujo, P. Palmeira, J. A. Amaral, and V. S. Sales. 2005. [Total and specific IgA in colostrum and milk of mothers of Natal-Rio Grande do Norte, Brasil]. *Acta Cir Bras* 20 Suppl 1:178-184.
- Arola, A., H. Kalimo, O. Ruuskanen, and T. Hyypia. 1995. Experimental myocarditis induced by two different coxsackievirus B3 variants: aspects of pathogenesis and comparison of diagnostic methods. *J Med Virol* 47 (3):251-259.
- Asensi, M. T., C. Martinez-Costa, and J. Buesa. 2006. Anti-rotavirus antibodies in human milk: quantification and neutralizing activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 42 (5):560-567.
- Baron, J. L., J. L. Li, M. L. McKerlie, J. M. Shabot, and D. H. Coppenhaver. 1986. A new subtype of a natural viral inhibitor (CVI) that is stable in the gastrointestinal tract. *Microb Pathog* 1 (3):241-247.
- Baron, S., A. K. Chopra, D. H. Coppenhaver, B. B. Gelman, J. Poast, and I. P. Singh. 1998. A host defense role for a natural antiviral substance in the nervous system. *J Neuroimmunol* 85 (2):168-173.
- Baron, S., R. M. Friedman, and C. E. Buckler. 1963. Properties of poliovirus inhibitor from monkey brain. *Proc Soc Exp Biol Med* 113:107-110.
- Baron, S., and L. McKerlie. 1981. Broadly active inhibitor of viruses spontaneously produced by many cell types in culture. *Infect Immun* 32 (2):449-453.
- Baron, S., D. Niesel, I. P. Singh, L. McKerlie, J. Poast, A. Chopra, G. Antonelli, F. Dianzani, and D. H. Coppenhaver. 1989. Recently described innate broad spectrum virus inhibitors. *Microb Pathog* 7 (4):237-247.
- Berg, A. K., A. Elshebani, A. Andersson, and G. Frisk. 2005. dsRNA formed as an intermediate during Coxsackievirus infection does not induce NO production in a beta-cell line with or without addition of IFN-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 327 (3):780-788.
- Bessaud, M., S. Pillet, W. Ibrahim, M. L. Joffret, B. Pozzetto, F. Delpeyroux, and I. Gouandjika-Vasilache. 2012. Molecular characterization of human enteroviruses in the Central African Republic: uncovering wide diversity and identification of a new human enterovirus A71 genogroup. *J Clin Microbiol* 50 (5):1650-1658.
- Bjorksten, B., L. G. Burman, P. De Chateau, B. Fredrikzon, L. Gothefors, and O. Hernell. 1980. Collecting and banking human milk: to heat or not to heat? *Br Med J* 281 (6243):765-769.
- Bode, L. 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22 (9):1147-1162.
- Bonner-Weir, S. 2001. beta-cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes* 50 Suppl 1:S20-24.

- Bonner-Weir, S., L. A. Baxter, G. T. Schuppin, and F. E. Smith. 1993. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42 (12):1715-1720.
- Bonner-Weir, S., E. Toschi, A. Inada, P. Reitz, S. Y. Fonseca, T. Aye, and A. Sharma. 2004. The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatr Diabetes* 5 Suppl 2:16-22.
- Bopegamage, S., M. Borsanyiova, A. Vargova, A. Petrovicova, M. Benkovicova, and P. Gomolcak. 2003. Coxsackievirus infection of mice. I. Viral kinetics and histopathological changes in mice experimentally infected with coxsackieviruses B3 and B4 by oral route. *Acta Virol* 47 (4):245-251.
- Bortell, R., and C. Yang. 2012. The BB Rat as a Model of Human Type 1 Diabetes. *Methods Mol Biol* 933:31-44.
- Brilot, F., W. Chehadeh, C. Charlet-Renard, H. Martens, V. Geenen, and D. Hober. 2002. Persistent infection of human thymic epithelial cells by coxsackievirus B4. *J Virol* 76 (10):5260-5265.
- Butler, A. E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R. A. Rizza, and P. C. Butler. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52 (1):102-110.
- Cardwell, C. R., L. C. Stene, G. Joner, O. Cinek, J. Svensson, M. J. Goldacre, R. C. Parslow, P. Pozzilli, G. Brigis, D. Stoyanov, B. Urbonaite, S. Sipetic, E. Schober, C. Ionescu-Tirgoviste, G. Devoti, C. E. de Beaufort, K. Buschard, and C. C. Patterson. 2008. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* 51 (5):726-735.
- Cello, J., and B. Svennerholm. 1994. Detection of enterovirus-specific total and polymeric IgA antibodies in serum using a synthetic peptide or heated virion antigen in ELISA. *J Med Virol* 44 (4):422-427.
- Chapman, N. M., and K. S. Kim. 2008. Persistent coxsackievirus infection: enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr Top Microbiol Immunol* 323:275-292.
- Chehadeh, W., J. Kerr-Conte, F. Pattou, G. Alm, J. Lefebvre, P. Wattre, and D. Hober. 2000. Persistent infection of human pancreatic islets by coxsackievirus B is associated with alpha interferon synthesis in beta cells. *J Virol* 74 (21):10153-10164.
- Chehadeh, W., J. Weill, M. C. Vantghem, G. Alm, J. Lefebvre, P. Wattre, and D. Hober. 2000. Increased level of interferon-alpha in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with coxsackievirus B infection. *J Infect Dis* 181 (6):1929-1939.
- Coombes, J. L., and F. Powrie. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8 (6):435-446.
- Coppa, G. V., L. Zampini, T. Galeazzi, and O. Gabrielli. 2006. Prebiotics in human milk: a review. *Dig Liver Dis* 38 Suppl 2:S291-294.
- Desailloud, R., F. Sane, D. Caloone, and D. Hober. 2009. Persistent infection of a carcinoma thyroid cell line with coxsackievirus B. *Thyroid* 19 (4):369-374.
- Dominguez-Bello, M. G., E. K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, N. Fierer, and R. Knight. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (26):11971-11975.
- Dotta, F., S. Censini, A. G. van Halteren, L. Marselli, M. Masini, S. Dionisi, F. Mosca, U. Boggi, A. O. Muda, S. D. Prato, J. F. Elliott, A. Covacci, R. Rappuoli, B. O. Roep, and P. Marchetti. 2007. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (12):5115-5120.

- Eizirik, D. L., M. L. Colli, and F. Ortis. 2009. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 5 (4):219-226.
- Elliott, R. B., S. N. Reddy, N. J. Bibby, and K. Kida. 1988. Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 31 (1):62-64.
- Engfer, M. B., B. Stahl, B. Finke, G. Sawatzki, and H. Daniel. 2000. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 71 (6):1589-1596.
- Fanjul, M., V. Gmyr, C. Sengenès, G. Ratovo, M. Dufresne, B. Lefebvre, J. Kerr-Conte, and E. Hollande. 2010. Evidence for epithelial-mesenchymal transition in adult human pancreatic exocrine cells. *J Histochem Cytochem* 58 (9):807-823.
- Forsyth, N. R., W. E. Wright, and J. W. Shay. 2002. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69 (4-5):188-197.
- Fujioka, S., Y. Kitaura, H. Deguchi, A. Shimizu, T. Isomura, H. Suma, and H. N. Sabbah. 2004. Evidence of viral infection in the myocardium of American and Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 94 (5):602-605.
- Gale, E. A. 2002. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 51 (12):3353-3361.
- Gao, R., J. Ustinov, M. A. Pulkkinen, K. Lundin, O. Korsgren, and T. Otonkoski. 2003. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 52 (8):2007-2015.
- Gerna, G., E. Cattaneo, P. M. Cereda, M. G. Revelo, and G. Achilli. 1980. Human coronavirus OC43 serum inhibitor and neutralizing antibody by a new plaque-reduction assay. *Proc Soc Exp Biol Med* 163 (3):360-366.
- Githens, S. 1988. The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7 (4):486-506.
- Gmyr, V., J. Kerr-Conte, S. Belaich, B. Vandewalle, E. Leteurtre, M. C. Vantyghem, M. Lecomte-Houcke, C. Proye, J. Lefebvre, and F. Pattou. 2000. Adult human cytokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 in vitro: further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans. *Diabetes* 49 (10):1671-1680.
- Grapin-Botton, A. 2005. Ductal cells of the pancreas. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (3):504-10.
- Green, J., D. Casabonne, and R. Newton. 2004. Coxsackie B virus serology and Type 1 diabetes mellitus: a systematic review of published case-control studies. *Diabet Med* 21 (6):507-514.
- Gronlund, M. M., O. P. Lehtonen, E. Eerola, and P. Kero. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28 (1):19-25.
- Gueant, J. L., B. Champigneulle, P. Gaucher, and J. P. Nicolas. 1990. Malabsorption of vitamin B12 in pancreatic insufficiency of the adult and of the child. *Pancreas* 5 (5):559-567.
- Hanson, L. A., M. Hahn-Zoric, M. Berndes, R. Ashraf, V. Herias, F. Jalil, T. I. Bhutta, A. Laeeq, and I. Mattsby-Baltzer. 1994. Breast feeding: overview and breast milk immunology. *Acta Paediatr Jpn* 36 (5):557-561.
- Hao, E., B. Tyrberg, P. Itkin-Ansari, J. R. Lakey, I. Geron, E. Z. Monosov, M. Barcova, M. Mercola, and F. Levine. 2006. Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med* 12 (3):310-316.

- Hardikar, A. A., B. Marcus-Samuels, E. Geras-Raaka, B. M. Raaka, and M. C. Gershengorn. 2003. Human pancreatic precursor cells secrete FGF2 to stimulate clustering into hormone-expressing islet-like cell aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (12):7117-7122.
- Harmsen, H. J., A. C. Wildeboer-Veloo, G. C. Raangs, A. A. Wagendorp, N. Klijn, J. G. Bindels, and G. W. Welling. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30 (1):61-67.
- Haverkos, H. W., N. Battula, D. P. Drotman, and O. M. Rennert. 2003. Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* 57 (9):379-385.
- Heim, A., A. Canu, P. Kirschner, T. Simon, G. Mall, P. H. Hofschneider, and R. Kandolf. 1992. Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackievirus B3-infected carrier cultures of human myocardial fibroblasts. *J Infect Dis* 166 (5):958-965.
- Heremans, Y., M. Van De Casteele, P. in't Veld, G. Gradwohl, P. Serup, O. Madsen, D. Pipeleers, and H. Heimberg. 2002. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol* 159 (2):303-312.
- Herrera-Insua, I., H. F. Gomez, V. A. Diaz-Gonzalez, P. Chaturvedi, D. S. Newburg, and T. G. Cleary. 2001. Human milk lipids bind Shiga toxin. *Adv Exp Med Biol* 501:333-339.
- Hober, D., and F. Sane. 2010. Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes. *Discov Med* 10 (51):151-160.
- Hober, D., and P. Sauter. 2010. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol* 6 (5):279-289.
- Horwitz, M. S., T. Krahl, C. Fine, J. Lee, and N. Sarvetnick. 1999. Protection from lethal coxsackievirus-induced pancreatitis by expression of gamma interferon. *J Virol* 73 (3):1756-1766.
- Huang, X., Y. Li, and C. Y. Zheng. 2009. A novel single-cell quantitative real-time RT-PCR method for quantifying foot-and-mouth disease viral RNA. *J Virol Methods* 155 (2):150-156.
- Hui, H., C. Wright, and R. Perfetti. 2001. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50 (4):785-796.
- Hummel, M., E. Bonifacio, M. Stern, J. Dittler, A. Schimmel, and A. G. Ziegler. 2000. Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with type I diabetes. *Diabetologia* 43 (8):1005-1011.
- Hummel, M., M. Fuchtenbusch, M. Schenker, and A. G. Ziegler. 2000. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care* 23 (7):969-974.
- Hyoty, H., M. Hiltunen, M. Knip, M. Laakkonen, P. Vahasalo, J. Karjalainen, P. Koskela, M. Roivainen, P. Leinikki, T. Hovi, and et al. 1995. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes* 44 (6):652-657.
- Isaacs, C. E., S. Kashyap, W. C. Heird, and H. Thormar. 1990. Antiviral and antibacterial lipids in human milk and infant formula feeds. *Arch Dis Child* 65 (8):861-864.
- Jaidane, H., and D. Hober. 2008. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 34 (6 Pt 1):537-548.
- Jaidane, H., F. Sane, J. Gharbi, M. Aouni, M. B. Romond, and D. Hober. 2009. Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models. *Diabetes Metab Res Rev* 25 (7):591-603.

- Jaidane, H., P. Sauter, F. Sane, A. Goffard, J. Gharbi, and D. Hober. 2010. Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Rev Med Virol* 20 (5):265-280.
- Kalliomaki, M., A. Ouwehand, H. Arvilommi, P. Kero, and E. Isolauri. 1999. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol* 104 (6):1251-1257.
- Kankaanpaa, P., K. Nurmela, A. Erkkila, M. Kalliomaki, D. Holmberg-Marttila, S. Salminen, and E. Isolauri. 2001. Polyunsaturated fatty acids in maternal diet, breast milk, and serum lipid fatty acids of infants in relation to atopy. *Allergy* 56 (7):633-638.
- Karvonen, M., J. Tuomilehto, I. Libman, and R. LaPorte. 1993. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia* 36 (10):883-892.
- Karzon, D. T. 1956. Non-specific viral inactivating substance (VIS) in human and mammalian sera; natural antagonists to the inactivator of Newcastle disease virus and observations on the nature of the union between the inactivator and virus. *J Immunol* 76 (6):454-463.
- Kitamura, T., Y. Miyagawa, and Y. Tanaka. 1973. Studies on a heat-labile variola virus inhibitor in normal sera. I. Detection by the variola focus reduction assay and its general characteristics. *Intervirology* 1 (4):278-287.
- Kondoh, H., K. Kobayashi, and K. Hagiwara. 1987. A simple procedure for the isolation of human secretory IgA of IgA1 and IgA2 subclass by a jackfruit lectin, jacalin, affinity chromatography. *Mol Immunol* 24 (11):1219-1222.
- Kondoh, H., K. Kobayashi, K. Hagiwara, and T. Kajii. 1986. Jacalin, a jackfruit lectin, precipitates IgA1 but not IgA2 subclass on gel diffusion reaction. *J Immunol Methods* 88 (2):171-173.
- Kritzik, M. R., T. Krahl, A. Good, D. Gu, C. Lai, H. Fox, and N. Sarvetnick. 2000. Expression of ErbB receptors during pancreatic islet development and regrowth. *J Endocrinol* 165 (1):67-77.
- Kumar, S., M. L. McKerlie, T. B. Albrecht, A. S. Goldman, and S. Baron. 1984. A broadly active viral inhibitor in human and animal organ extracts and body fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* 177 (1):104-111.
- Lefebvre, B., S. Belaich, J. Longue, B. Vandewalle, J. Oberholzer, V. Gmyr, F. Pattou, and J. Kerr-Conte. 2010. 5'-AZA induces Ngn3 expression and endocrine differentiation in the PANC-1 human ductal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 391 (1):305-309.
- Lonrot, M., K. Korpela, M. Knip, J. Ilonen, O. Simell, S. Korhonen, K. Savola, P. Muona, T. Simell, P. Koskela, and H. Hyoty. 2000. Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes* 49 (8):1314-1318.
- Malcova, H., Z. Sumnik, P. Drevinek, J. Venhacova, J. Lebl, and O. Cinek. 2006. Absence of breast-feeding is associated with the risk of type 1 diabetes: a case-control study in a population with rapidly increasing incidence. *Eur J Pediatr* 165 (2):114-119.
- Martin, R., E. Jimenez, H. Heilig, L. Fernandez, M. L. Marin, E. G. Zoetendal, and J. M. Rodriguez. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 75 (4):965-969.
- Martinez, I., G. Wallace, C. Zhang, R. Legge, A. K. Benson, T. P. Carr, E. N. Moriyama, and J. Walter. 2009. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. *Appl Environ Microbiol* 75 (12):4175-4184.

- Matteucci, D., M. Paglianti, A. M. Giangregorio, M. R. Capobianchi, F. Dianzani, and M. Bendinelli. 1985. Group B coxsackieviruses readily establish persistent infections in human lymphoid cell lines. *J Virol* 56 (2):651-654.
- McInerney, M. F., S. B. Pek, and D. W. Thomas. 1991. Prevention of insulinitis and diabetes onset by treatment with complete Freund's adjuvant in NOD mice. *Diabetes* 40 (6):715-725.
- Meloni, T., A. M. Marinaro, M. C. Mannazzu, A. Ogana, C. La Vecchia, E. Negri, and C. Colombo. 1997. IDDM and early infant feeding. Sardinian case-control study. *Diabetes Care* 20 (3):340-342.
- Mena, I., C. Fischer, J. R. Gebhard, C. M. Perry, S. Harkins, and J. L. Whitton. 2000. Coxsackievirus infection of the pancreas: evaluation of receptor expression, pathogenesis, and immunopathology. *Virology* 271 (2):276-288.
- Muegge, B. D., J. Kuczynski, D. Knights, J. C. Clemente, A. Gonzalez, L. Fontana, B. Henrissat, R. Knight, and J. I. Gordon. 2011. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 332 (6032):970-974.
- Mueller, D. B., K. Koczwara, A. S. Mueller, J. Pallauf, A. G. Ziegler, and E. Bonifacio. 2009. Influence of early nutritional components on the development of murine autoimmune diabetes. *Ann Nutr Metab* 54 (3):208-217.
- Nair, S., K. C. Leung, W. D. Rawlinson, Z. Naing, and M. E. Craig. 2010. Enterovirus infection induces cytokine and chemokine expression in insulin-producing cells. *J Med Virol* 82 (11):1950-1957.
- Nakhooda, A. F., A. A. Like, C. I. Chappel, F. T. Murray, and E. B. Marliss. 1977. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes* 26 (2):100-112.
- Newburg, D. S., G. M. Ruiz-Palacios, M. Altaye, P. Chaturvedi, M. L. Guerrero, J. K. Meinzen-Derr, and A. L. Morrow. 2004. Human milk alpha1,2-linked fucosylated oligosaccharides decrease risk of diarrhea due to stable toxin of *E. coli* in breastfed infants. *Adv Exp Med Biol* 554:457-461.
- Oberste, M. S. 2008. Comparative genomics of the coxsackie B viruses and related enteroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 323:33-47.
- Oberste, M. S., K. Maher, and M. A. Pallansch. 2007. Complete genome sequences for nine simian enteroviruses. *J Gen Virol* 88 (Pt 12):3360-3372.
- Ochoa-Reparaz, J., D. W. Mielcarz, L. E. Ditrio, A. R. Burroughs, D. M. Foureau, S. Haque-Begum, and L. H. Kasper. 2009. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 183 (10):6041-6050.
- Oddy, W. H., P. G. Holt, P. D. Sly, A. W. Read, L. I. Landau, F. J. Stanley, G. E. Kendall, and P. R. Burton. 1999. Association between breast feeding and asthma in 6 year old children: findings of a prospective birth cohort study. *BMJ* 319 (7213):815-819.
- Oikarinen, M., S. Tauriainen, S. Oikarinen, T. Honkanen, P. Collin, I. Rantala, M. Maki, K. Kaukinen, and H. Hyoty. 2012. Type 1 diabetes is associated with enterovirus infection in gut mucosa. *Diabetes* 61 (3):687-691.
- Okada, H., C. Kuhn, H. Feillet, and J. F. Bach. 2010. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 160 (1):1-9.
- Oldstone, M. B. 1988. Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science* 239 (4839):500-502.
- Orinska, Z., E. Bulanova, V. Budagian, M. Metz, M. Maurer, and S. Bulfone-Paus. 2005. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood* 106 (3):978-987.

- Otonkoski, T., M. Roivainen, O. Vaarala, B. Dinesen, J. A. Leipala, T. Hovi, and M. Knip. 2000. Neonatal Type 1 diabetes associated with maternal echovirus 6 infection: a case report. *Diabetologia* 43 (10):1235-1238.
- Pallansh, M. A., R. P. Roos, D. M. Knipe. 2006. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: *Fields Virology 2007* (6th Ed.). Lippincott Williams and Wilkins, PA, USA, 839-894.
- Pavio, N., M. H. Buc-Caron, and F. Colbere-Garapin. 1996. Persistent poliovirus infection of human fetal brain cells. *J Virol* 70 (9):6395-6401.
- Pinkert, S., K. Klingel, V. Lindig, A. Dorner, H. Zeichhardt, O. B. Spiller, and H. Fechner. 2011. Virus-host coevolution in a persistently coxsackievirus B3-infected cardiomyocyte cell line. *J Virol* 85 (24):13409-13419.
- Pozzilli, P., A. Signore, A. J. Williams, and P. E. Beales. 1993. NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. *Immunol Today* 14 (5):193-196.
- Ramirez-Santana, C., F. J. Perez-Cano, C. Audi, M. Castell, M. G. Moretones, M. C. Lopez-Sabater, C. Castellote, and A. Franch. 2012. Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrum. *J Dairy Sci* 95 (5):2319-2325.
- Raptopoulou-Gigi, M., K. Marwick, and D. B. McClelland. 1977. Antimicrobial proteins in sterilised human milk. *Br Med J* 1 (6052):12-14.
- Richardson, S. J., A. Willcox, A. J. Bone, A. K. Foulis, and N. G. Morgan. 2009. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 52 (6):1143-1151.
- Roivainen, M., S. Rasilainen, P. Ylipaasto, R. Nissinen, J. Ustinov, L. Bouwens, D. L. Eizirik, T. Hovi, and T. Otonkoski. 2000. Mechanisms of coxsackievirus-induced damage to human pancreatic beta-cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (1):432-440.
- Roque-Barreira, M. C., and A. Campos-Neto. 1985. Jacalin: an IgA-binding lectin. *J Immunol* 134 (3):1740-1743.
- Sadauskaite-Kuehne, V., J. Ludvigsson, Z. Padaiga, E. Jasinskiene, and U. Samuelsson. 2004. Longer breastfeeding is an independent protective factor against development of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Diabetes Metab Res Rev* 20 (2):150-157.
- Sadeharju, K., M. Knip, S. M. Virtanen, E. Savilahti, S. Tauriainen, P. Koskela, H. K. Akerblom, and H. Hyoty. 2007. Maternal antibodies in breast milk protect the child from enterovirus infections. *Pediatrics* 119 (5):941-946.
- Sadelain, M. W., H. Y. Qin, J. Lauzon, and B. Singh. 1990. Prevention of type I diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Diabetes* 39 (5):583-589.
- Sakaguchi, M., T. Tomomasa, and T. Kuroume. 1995. Cytolytic action of stored human milk on blood cells in vitro. *J Perinat Med* 23 (4):293-300.
- Sane, F., I. Moumna, and D. Hober. 2011. Group B coxsackieviruses and autoimmunity: focus on Type 1 diabetes. *Expert Rev Clin Immunol* 7 (3):357-366.
- Sane, F., P. Sauter, S. Fronval, A. Goffard, A. Dewilde, and D. Hober. 2008. [Fruit of the emergence of an enterovirus: acute haemorrhagic conjunctivitis]. *Ann Biol Clin (Paris)* 66 (5):485-492.
- Sarmiento, L., E. Cabrera-Rode, L. Lekuleni, I. Cuba, G. Molina, M. Fonseca, L. Heng-Hung, A. D. Borroto, P. Gonzalez, P. Mas-Lago, and O. Diaz-Horta. 2007. Occurrence of enterovirus RNA in serum of

children with newly diagnosed type 1 diabetes and islet cell autoantibody-positive subjects in a population with a low incidence of type 1 diabetes. *Autoimmunity* 40 (7):540-545.

- Satoh, M., G. Tamura, I. Segawa, K. Hiramori, and R. Satodate. 1994. Enteroviral RNA in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 15 (7):934-939.
- Schack-Nielsen, L., A. Larnkjaer, and K. F. Michaelsen. 2005. Long term effects of breastfeeding on the infant and mother. *Adv Exp Med Biol* 569:16-23.
- Seganti, L., A. M. Di Biase, M. Marchetti, A. Pietrantonio, A. Tinari, and F. Superti. 2004. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. *Biometals* 17 (3):295-299.
- Serreze, D. V., E. W. Ottendorfer, T. M. Ellis, C. J. Gauntt, and M. A. Atkinson. 2000. Acceleration of type 1 diabetes by a coxsackievirus infection requires a preexisting critical mass of autoreactive T-cells in pancreatic islets. *Diabetes* 49 (5):708-711.
- Shi, S. R., R. J. Cote, and C. R. Taylor. 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* 45 (3):327-343.
- Shortridge, K. F., and W. K. Ho. 1974. Human serum lipoproteins as inhibitors of haemagglutination for selected togaviruses. *J Gen Virol* 23 (1):113-116.
- Singh, I. P., A. K. Chopra, D. H. Coppenhaver, G. M. Anantharamaiah, and S. Baron. 1999. Lipoproteins account for part of the broad non-specific antiviral activity of human serum. *Antiviral Res* 42 (3):211-218.
- Singh, I. P., A. K. Chopra, D. H. Coppenhaver, E. Smith, J. Poast, and S. Baron. 1995. Vertebrate brains contain a broadly active antiviral substance. *Antiviral Res* 27 (4):375-388.
- Singh, I. P., D. H. Coppenhaver, A. K. Chopra, and S. Baron. 1992. Further characterization of a broad-spectrum antiviral substance in human serum. *Viral Immunol* 5 (4):293-303.
- Singh, I. P., D. H. Coppenhaver, A. K. Chopra and S. Baron. 2001. Innate gastrointestinal immunity: characterization of broadly active viral inhibitors. *Antiviral Res* 49 (3):157-167.
- Sun, F., Y. Li, T. Jia, Y. Ling, L. Liang, G. Liu, H. Chen, and S. Chen. 2012. Differential expression of coxsackievirus and adenovirus receptor on alveolar epithelial cells between fetal and adult mice determines their different susceptibility to coxsackievirus B infection. *Arch Virol* 157 (6):1101-1111.
- Surmeier, D. J., W. J. Song, and Z. Yan. 1996. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16 (20):6579-6591.
- Tauriainen, S., S. Oikarinen, M. Oikarinen, and H. Hyoty. 2011. Enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Semin Immunopathol* 33 (1):45-55.
- Teitelman, G., and J. K. Lee. 1987. Cell lineage analysis of pancreatic islet development: glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursors present in the pancreatic duct. *Dev Biol* 121 (2):454-466.
- Thiry, L., J. Cogniaux-Le Clerc, J. Content, and L. Tack. 1978. Factors which influence inactivation of vesicular stomatitis virus by fresh human serum. *Virology* 87 (2):384-393.
- Tirabassi, R. S., D. L. Guberski, E. P. Blankenhorn, J. H. Leif, B. A. Woda, Z. Liu, D. Winans, D. L. Greiner, and J. P. Mordes. 2010. Infection with viruses from several families triggers autoimmune diabetes in LEW*1WR1 rats: prevention of diabetes by maternal immunization. *Diabetes* 59 (1):110-118.
- Tsueng, G., J. M. Tabor-Godwin, A. Gopal, C. M. Ruller, S. Deline, N. An, R. F. Frausto, R. Milner, S. J. Crocker, J. L. Whitton, and R. Feuer. 2011. Coxsackievirus preferentially replicates and induces cytopathic effects in undifferentiated neural progenitor cells. *J Virol* 85 (12):5718-5732.

- Vaarala, O. 2011. The gut as a regulator of early inflammation in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18 (4):241-247.
- Vella, C., A. J. Easton, R. P. Eglin, C. L. Brown, and L. Perry. 1991. Coxsackie virus B4 infection of the mouse pancreas: I. Detection of virus-specific RNA in the pancreas by in situ hybridisation. *J Med Virol* 35 (1):46-49.
- Verdu, E. F., P. Bercik, B. Cukrowska, M. A. Farre-Castany, H. Bouzourene, E. Saraga, A. L. Blum, I. Cortesy-Theulaz, H. Tlaskalova-Hogenova, and P. Michetti. 2000. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 120 (1):46-50.
- Vila, M. R., J. Lloreta, and F. X. Real. 1994. Normal human pancreas cultures display functional ductal characteristics. *Lab Invest* 71 (3):423-431.
- Wang, H. B., A. V. Laverghetta, R. Foehring, Y. P. Deng, Z. Sun, K. Yamamoto, W. L. Lei, Y. Jiao, and A. Reiner. 2006. Single-cell RT-PCR, in situ hybridization histochemical, and immunohistochemical studies of substance P and enkephalin co-occurrence in striatal projection neurons in rats. *J Chem Neuroanat* 31 (3):178-199.
- Wang, R. N., G. Kloppel, and L. Bouwens. 1995. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38 (12):1405-1411.
- Washburn, L. R., H. Dang, J. Tian, and D. L. Kaufman. 2007. The postnatal maternal environment influences diabetes development in nonobese diabetic mice. *J Autoimmun* 28 (1):19-23.
- Welsh, R. M., Jr., F. C. Jensen, N. R. Cooper, and M. B. Oldstone. 1976. Inactivation of lysis of oncornaviruses by human serum. *Virology* 74 (2):432-440.
- Wen, L., R. E. Ley, P. Y. Volchkov, P. B. Stranges, L. Avanesyan, A. C. Stonebraker, C. Hu, F. S. Wong, G. L. Szot, J. A. Bluestone, J. I. Gordon, and A. V. Chervonsky. 2008. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 455 (7216):1109-1113.
- Wu, Y., J. Li, S. Saleem, S. P. Yee, A. A. Hardikar, and R. Wang. 2010. c-Kit and stem cell factor regulate PANC-1 cell differentiation into insulin- and glucagon-producing cells. *Lab Invest* 90 (9):1373-1384.
- Yap, I. S., G. Giddings, E. Pocock, and J. K. Chantler. 2003. Lack of islet neogenesis plays a key role in beta-cell depletion in mice infected with a diabetogenic variant of coxsackievirus B4. *J Gen Virol* 84 (Pt 11):3051-3068.
- Yeung, W. C., W. D. Rawlinson, and M. E. Craig. 2011. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ* 342:d35.
- Yin, H., A. K. Berg, T. Tuvemo, and G. Frisk. 2002. Enterovirus RNA is found in peripheral blood mononuclear cells in a majority of type 1 diabetic children at onset. *Diabetes* 51 (6):1964-1971.
- Ylipaasto, P., K. Klingel, A. M. Lindberg, T. Otonkoski, R. Kandolf, T. Hovi, and M. Roivainen. 2004. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia* 47 (2):225-239.
- Yoon, J. W., M. Austin, T. Onodera, and A. L. Notkins. 1979. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 300 (21):1173-1179.
- Zaman, S., B. Carlsson, A. Morikawa, S. Jeansson, I. Narayanan, K. Thiringer, F. Jalil, and L. A. Hanson. 1993. Poliovirus antibody titres, relative affinity, and neutralising capacity in maternal milk. *Arch Dis Child* 68 (2):198-201.