

Université de Montréal

**TRK-Fused Gene (TFG), une protéine impliquée dans le système de sécrétion de protéines, est une composante essentielle de la réponse antivirale innée**

par

Alexandre Marineau

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté de Pharmacie  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie moléculaire

Novembre, 2017

© Alexandre Marineau, 2017

## RÉSUMÉ

La production d'interférons de type I (IFN) représente un événement signalétique nécessaire à la formation d'une réponse antivirale. La détermination du rôle de nouveaux régulateurs de l'immunité innée pourrait permettre le développement d'un arsenal thérapeutique conçu de manière à renforcer les réponses antivirales de l'hôte. La production des IFNs et des *IFN-stimulated genes* (ISG) est soutenue par la reconnaissance de composantes virale par les *retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors* (RLR). Suivant leur activation, *tumor necrosis factor receptor associated factor 3* (TRAF3) est recruté auprès de son substrat, *TRAF family member-associated nuclear factor (NF)-kappa-B activator (TANK)-binding kinase 1* (TBK1), au niveau des compartiments cellulaires contenant la *mitochondrial antiviral signaling adaptor* (MAVS). Toutefois, la régulation de tels événements demeure largement indéterminée. Ici, nous identifions *tropomyosin-receptor kinase (TRK)-fused gene* (TFG), une protéine impliquée dans la biogenèse des vésicules *coat protein complex II* (COPII), en tant que nouveau partenaire de TRAF3 facilitant son recrutement à MAVS et à TBK1. La diminution de l'expression de TFG compromet en fait la formation d'un état antiviral en affectant la phosphorylation de TBK1, l'activation d'*IFN regulatory factor 3* (IRF3) et la production d'ISGs et d'IFN- $\beta$ . Certains résultats préliminaires révèlent aussi un nouveau lien entre les voies de signalisation des RLR et de la *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) jusqu'alors présumées indépendantes. En effet, suivant une infection virale, la phosphorylation de mTOR sur sa Ser2159 par TBK1, un événement nécessitant l'expression de TFG, permet l'activation de mTOR et la traduction subséquente d'ISGs. Notre étude identifie ainsi TFG en tant que composante essentielle de la réponse antivirale aux IFNs de type I.

**Mots-clés** : Immunité innée, Réponse antivirale, Interféron, TRK-Fused Gene, RIG-I, MAVS, TRAF3, TBK1, mTOR

## ABSTRACT

The type I interferons (IFN) response represents key signaling event leading to potent antiviral state. As such, deciphering roles of new regulators of innate immunity could transform the antiviral treatment paradigm by introducing novel panviral therapeutics designed to reinforce antiviral host responses. The IFNs and IFN-stimulated genes (ISGs) production is supported by the recognition of RNA viruses by pattern-recognition receptors, including retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLR). Upon sensing of viral RNA, the E3 ubiquitine ligase tumor necrosis factor receptor associated factor 3 (TRAF3) is recruited along with its substrate TRAF family member-associated nuclear factor (NF)-kappa-B activator (TANK)-binding kinase 1 (TBK1) to mitochondrial antiviral signaling adaptor (MAVS)-containing subcellular compartments. However, regulation of such events remains largely unresolved. Here, we identify tropomyosin-receptor kinase (TRK)-fused gene (TFG), a protein involved in coat protein complex II (COPII)-coated vesicle biogenesis, as a new TRAF3-interacting protein allowing the efficient recruitment of TRAF3 to MAVS and TBK1 upon RLR activation following viral infection. Silencing its expression also compromised virus-induced phosphorylation of TBK1 on Ser172, activation of IFN regulatory factor 3 (IRF3), and production of ISGs and IFN- $\beta$  globally resulting in a decreased antiviral state. Preliminary results also identify a new link between the previously unrelated RLR and mammalian target of Rapamycin (mTOR) signaling pathways. Indeed, following viral infection, TFG-dependant phosphorylation of mTOR on Ser2159 by TBK1 seems to allow the activation of mTOR and the following translation of ISGs. Our study therefore identifies TFG as an essential component of type I IFN antiviral response by stimulating both the transcription and translation of antiviral agents.

**Keywords** : Innate immunity, Antiviral response, Interferon, TRK-Fused Gene, RIG-I, MAVS, TRAF3, TBK1, mTOR

# TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>ii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des sigles et des acronymes .....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>xi</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xii</b>
<b>Chapitre 1 – Immunité innée antivirale.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Contexte .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 La réponse antivirale innée.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Les interférons.....	6
1.2.2 Reconnaissance des virus.....	16
1.2.3 Compartimentalisation de l’immunité innée.....	38
1.2.4 TRK-Fused Gene (TFG) : un survol.....	46
<b>Chapitre 2 – Objet du mémoire .....</b>	<b>51</b>
<b>2.1 Contexte sommaire.....</b>	<b>51</b>
<b>2.2 Hypothèses et Objectifs de recherche .....</b>	<b>54</b>
2.2.1 Objectif 1 : Confirmation de l’interaction entre TFG et TRAF3, et détermination de la localisation sous-cellulaire de TFG.....	56
2.2.2 Objectif 2 : Détermination du rôle de TFG dans l’organisation et la formation de complexes protéiques signalétiques.....	56
2.2.3 Objectif 3 : Caractérisation du rôle fonctionnel de TFG dans la réponse antivirale innée.....	56
<b>Chapitre 3 – Caractérisation du rôle de TRK-Fused Gene (TFG) dans l’immunité innée antivirale. ....</b>	<b>57</b>

<b>3.1 Article : TRK-Fused Gene (TFG), a protein involved in protein secretion pathways, is essential for the efficient organization of the innate antiviral response.</b>	<b>57</b>
.....	
Contributions .....	57
Statut de la publication .....	57
Abstract .....	59
Importance.....	60
Introduction.....	61
Materials and Methods .....	64
Results.....	69
Acknowledgments .....	80
References: .....	81
Figure: .....	89
<b>3.2 TFG – de l’optimisation de la transcription à la régulation de la traduction des ISGs .....</b>	<b>104</b>
3.2.1 La régulation et les effets moléculaires de mTOR.....	104
3.2.2 TFG et le contrôle de la voie mTOR dans la réponse antivirale innée .....	110
<b>Chapitre 4 – Discussion et perspectives .....</b>	<b>117</b>
<b>4.1 TFG – un nouveau membre structurant de la voie de signalisation canonique des RLRs.....</b>	<b>117</b>
4.1.1 TFG et la réponse antivirale innée .....	118
4.1.2 TFG et le TRAFic des protéines .....	121
<b>4.2 TFG et la juxtaposition de mTOR et de TBK1 : impressions et perspectives .....</b>	<b>125</b>
<b>Chapitre 5 – Conclusion .....</b>	<b>132</b>
<b>Références .....</b>	<b>135</b>
<b>Annexe : article en co-auteur .....</b>	<b>i</b>
<b>Mise en contexte .....</b>	<b>i</b>
<b>Contribution.....</b>	<b>i</b>
<b>Article : Fine-tuning of the RIG-I-like receptor/interferon regulatory factor 3-dependent antiviral innate immune response by the glycogen synthase kinase 3/<math>\beta</math>-catenin pathway .....</b>	<b>ii</b>

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1

Figure 1 : Les éléments précoces et tardifs de la réponse antivirale innée. ....	13
Figure 2 : La voie de signalisation de TLR3 .....	21
Figure 3 : La voie de signalisation des TLR7, 8 et 9 .....	25
Figure 4 : La voie de signalisation des RLRs .....	33

### CHAPITRE 2

Figure 1 : Hypothèse de recherche du rôle potentiel de TFG dans la voie des RLRs. .....	55
--	----

### CHAPITRE 3

Figure 1: TFG interacts and colocalizes specifically with TRAF3.....	94
Figure 2: TFG accumulates within ER-to-Golgi compartments .....	95
Figure 3: TFG is part of MAVS-TRAF3-TBK1 molecular complex upon activation of intracellular RNA sensors .....	96
Figure 4: TFG is required for the formation of MAVS-TRAF3-TBK1 complex and for downstream signaling upon cytosolic RNA sensor activation. ....	98
Figure 5: TFG is required for optimal production of ISGs and type I IFN secretion upon viral infection .....	100
Figure 6: Knockdown of TFG increases viral replication and dissemination .....	102
Figure 7: Proposed unified model representing the implication of TFG in the organization of RLR-dependent antiviral innate immunity .....	103
Figure 8 : Régulation et rôle de mTORC1 dans le contrôle de la traduction des ARNm.....	106
Figure 9 : Le positionnement de TBK1 auprès de mTOR suivant une infection virale requiert l'expression de TFG.....	111
Figure 10 : TBK1 cible la sérine 2159 de mTOR.....	113

Figure 11 : L'induction de la phosphorylation de mTOR sur la Ser2159 suivant une infection virale est indépendante de la réponse aux interférons et nécessite l'expression de TFG. .... 115

Figure 12 : L'activité kinase de mTOR est importante la production optimale des ISGs suivant une infection virale. .... 116

#### CHAPITRE 4

Figure 1 : TFG influence la phosphorylation d'IRF3 en aval de la dégradation de MAVS. .... 119

Figure 2 : L'expression de TFG est nécessaire à la transcription des IFNs de type I et de type III..... 124

#### CHAPITRE 5

Figure 1 : Modèle unifié proposé du rôle de TFG..... 134

## LISTE DES SIGLES ET DES ACRONYMES

<b>4EBP</b>	<i>eIF4E-binding protein</i>
<b>5'-PPP</b>	<i>5'-triphosphates</i>
<b>5'UTR</b>	<i>5' untranslated region</i>
<b>ADNc</b>	<i>ADN complémentaire</i>
<b>AIM2</b>	<i>absent in melanoma 2</i>
<b>ALK</b>	<i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
<b>AP-1</b>	<i>activator protein 1</i>
<b>AP-3</b>	<i>adaptor protein 3</i>
<b>APC</b>	<i>antigen-presenting cell</i>
<b>ATF2</b>	<i>activating transcription factor 2</i>
<b>β-TRCP</b>	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
<b>BMDM</b>	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
<b>c-di-GMP</b>	<i>cyclic diguanylate monophosphate</i>
<b>CARD</b>	<i>caspase recruitment domain</i>
<b>CBP</b>	<i>CREB-binding protein</i>
<b>CC</b>	<i>coiled coil</i>
<b>CCL</b>	<i>CC-chemokine ligand</i>
<b>cDC</b>	<i>conventional dendritic cell</i>
<b>CDN</b>	<i>cyclic dinucleotides</i>
<b>cGAMP</b>	<i>cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate</i>
<b>cGAS</b>	<i>cGAMP synthase</i>
<b>CLR</b>	<i>C-type lectin-like receptor</i>
<b>COP</b>	<i>coat protein complex</i>
<b>Ct</b>	<i>comparative treshold</i>
<b>CTD</b>	<i>C-terminal RNA binding domain</i>
<b>DC</b>	<i>dendritic cell</i>
<b>DD</b>	<i>death domain</i>
<b>DENV</b>	<i>Dengue virus</i>
<b>DNA-PKcs</b>	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
<b>eIF4E</b>	<i>eukaryotic initiation factor 4E</i>
<b>EMCV</b>	<i>encephalomyocarditis virus</i>
<b>ER</b>	<i>endoplasmic reticulum</i>
<b>ERES</b>	<i>ER exit sites</i>
<b>ERGIC</b>	<i>ER-to-Golgi intermediate compartments</i>
<b>FADD</b>	<i>Fas-associated death domain-containing protein</i>
<b>FPPS</b>	<i>farnesyl diphosphate synthase</i>
<b>GAP</b>	<i>GTPase-activating protein</i>
<b>GCN5</b>	<i>general control of amino-acid synthesis 5</i>
<b>GEF</b>	<i>guaninenucleotide exchange factor</i>



<b>GSK-3</b>	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
<b>HAT</b>	<i>histones acetyltransferase</i>
<b>HCV</b>	<i>hepatitis C virus</i>
<b>HMGA1a</b>	<i>high mobility group AT-hook 1a</i>
<b>HPV</b>	<i>human papilloma virus</i>
<b>HSV</b>	<i>herpes simplex virus</i>
<b>IAV</b>	<i>influenza A virus</i>
<b>IFI16</b>	<i>IFN-<math>\gamma</math>-inducible protein 16</i>
<b>IFIT</b>	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats</i>
<b>IFN</b>	<i>interferon</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	<i>inhibitors of <math>\kappa</math>B</i>
<b>IKK</b>	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
<b>IL</b>	<i>interleukin</i>
<b>IRAK</b>	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
<b>IRES</b>	<i>internal ribosome entry sites</i>
<b>IRF</b>	<i>interferon regulatory factor</i>
<b>ISG</b>	<i>interferon-stimulated gene</i>
<b>ISRE</b>	<i>interferon-stimulated response element</i>
<b>JAK</b>	<i>Janus kinase</i>
<b>JEV</b>	<i>japanese encephalitis virus</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>LCMV</b>	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
<b>LGP2</b>	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
<b>LPS</b>	<i>lipopolysaccharide</i>
<b>LRO</b>	<i>lysosomes-related organelles</i>
<b>LRRFIP1</b>	<i>leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1</i>
<b>MAM</b>	<i>mitochondria-associated ER-membrane</i>
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
<b>MAVS</b>	<i>mitochondrial antiviral signaling adaptor</i>
<b>MDA5</b>	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
<b>MKK</b>	<i>MAPK kinases</i>
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>mTORC</b>	<i>mTOR complex</i>
<b>Mx</b>	<i>Myxovirus resistance GTPase</i>
<b>MyD88</b>	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
<b>NAP1</b>	<i>nucleosome assembly protein 1</i>
<b>NDV</b>	<i>Newcastle disease virus</i>
<b>NEMO</b>	<i>NF-<math>\kappa</math>B essential modifier</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>nuclear factor kappa-B</i>
<b>NK</b>	<i>natural killer cells</i>
<b>NLR</b>	<i>NOD-like receptor</i>
<b>NOD</b>	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>

<b>NOR1</b>	<i>neuron-derived orphan receptor 1</i>
<b>NS1</b>	<i>non-structural protein 1</i>
<b>NTRK1</b>	<i>neurotrophic tyrosine kinase receptor 1</i>
<b>OPT</b>	<i>optineurin</i>
<b>p70S6K</b>	<i>p70 S6 kinase</i>
<b>PAMP</b>	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>PB1</b>	<i>Phox/Bem 1P</i>
<b>pDC</b>	<i>plasmacytoid dendritic cell</i>
<b>PDCD4</b>	<i>programmed cell death 4 protein</i>
<b>poly(dA:dT)</b>	<i>acide polydéoxyadénylique-déoxythymidylique</i>
<b>poly(I:C)</b>	<i>acide polyinosinique-polycytidylique</i>
<b>PP1</b>	<i>protein phosphatase 1</i>
<b>PRD</b>	<i>positive regulation domains</i>
<b>PRR</b>	<i>pathogen recognition receptor</i>
<b>PTEN</b>	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
<b>RD</b>	<i>repressor domain</i>
<b>RHIM</b>	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
<b>RIG-I</b>	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
<b>RING</b>	<i>really interesting new gene</i>
<b>RIP</b>	<i>receptor-interacting protein</i>
<b>RLH</b>	<i>RIG-I-like helicase</i>
<b>RLR</b>	<i>RIG-I-like receptor</i>
<b>rpS6</b>	<i>ribosomal protein S6</i>
<b>RSV</b>	<i>respiratory syncytial virus</i>
<b>SCF</b>	<i>Skp, Cullin, F-box containing complex</i>
<b>SeV</b>	<i>Sendai virus</i>
<b>SFV</b>	<i>Semliki forest virus</i>
<b>SH2</b>	<i>Src homology region</i>
<b>SINTBAD</b>	<i>similar to NAP1 TBK1 adaptor</i>
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
<b>STING</b>	<i>stimulator of IFN genes</i>
<b>T6BD</b>	<i>TRAF6-binding domain</i>
<b>TAB</b>	<i>TAK1-binding protein</i>
<b>TAK</b>	<i>transforming growth factor-activated protein kinase</i>
<b>TANK</b>	<i>TRAF family member-associated NF-kappa-B activator</i>
<b>TBK1</b>	<i>TANK-binding kinase 1</i>
<b>tER</b>	<i>transitional ER</i>
<b>TFG</b>	<i>TRK-fused gene</i>
<b>TFIID</b>	<i>transcription factor II D</i>
<b>TIM</b>	<i>TRAF-interacting motifs</i>
<b>TLR</b>	<i>toll-like receptor</i>
<b>TNF</b>	<i>tumor necrosis factor</i>

<b>TNFRI</b>	<i>tumor necrosis factor receptor I</i>
<b>TRADD</b>	<i>TNFR-associated death domain</i>
<b>TRAF</b>	<i>TNFR-associated factor</i>
<b>Trex1</b>	<i>three-prime repair exonuclease 1</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN-<math>\beta</math></i>
<b>TRIM25</b>	<i>tripartite motif containing protein 25</i>
<b>TRK</b>	<i>tropomyosin-receptor kinase</i>
<b>TSC</b>	<i>tuberous sclerosis complex</i>
<b>TYK2</b>	<i>tyrosine kinase 2</i>
<b>VIH</b>	<i>virus de l'immunodéficience humaine</i>
<b>Viperin</b>	<i>virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, IFN-inducible</i>
<b>VSV</b>	<i>vesicular stomatitis virus</i>
<b>WCE</b>	<i>whole cell extracts</i>
<b>WNV</b>	<i>West Nile virus</i>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>c.-à-d.</b>	c'est-à-dire
<b>coll.</b>	collaborateurs
<b>p. ex.</b>	par exemple

## REMERCIEMENTS

L'achèvement d'une maîtrise ne peut se faire qu'avec l'aide et le soutien d'une multitude de personnes et de facteurs. J'aimerais ainsi prendre un moment pour remercier tous ceux qui ont rendu ces dernières années aussi enrichissantes que plaisantes. J'aimerais d'abord remercier ma conjointe, Arianne Lespérance, qui a toujours eu le mot juste pour me motiver. Ton amour, ta confiance et ton écoute ont fait toute la différence. J'aimerais aussi remercier mes parents pour leur soutien inconditionnel, et pour avoir fait de moi quelqu'un de rigoureux, de minutieux et de curieux. Votre support au courant de ma vie universitaire en a certainement facilité l'aboutissement et m'a grandement encouragé à persévérer. Merci à mon frère d'avoir été l'une des sources m'ayant inspirée à poursuivre des études en sciences pharmaceutiques et, aujourd'hui, en pharmacie. J'aimerais aussi souligner l'apport considérable de mes beaux-parents à l'achèvement de cette maîtrise et ce mémoire. Vous êtes pour moi des modèles inspirants tant sur le plan professionnel qu'au niveau personnel. Merci!

J'aimerais aussi souligner l'importante contribution de mon directeur de recherche, Marc Servant. À travers cette complicité et cette confiance mutuelle qui se sont installées au courant des dernières années, j'ai pu développer mon autonomie, mon sens critique et mon expertise en participant, entre autres, à l'écriture de demandes de subvention et d'articles scientifiques. Merci aussi à mes collègues d'avoir partagé ces dernières années avec moi. Florence, un exemple de rigueur, de dévouement et d'entre-aide, tu auras su instaurer une belle ambiance de collégialité et de collaboration. Merci aux autres membres du laboratoire. Kashif pour nos divers échanges et ce beau partenariat sur nos projets respectifs. Merci à Monique, Priscilla et Étienne pour les discussions et cet esprit d'entre-aide qui ont fait de ces dernières années des moments des plus enrichissants.

Merci à mes collègues du conseil d'administration des étudiants aux cycles supérieurs pour toutes nos rencontres, les mousseux, votre dévouement et votre contribution à la vie étudiante.

J'aimerais finalement souligner le soutien financier de diverses sociétés qui, par différentes bourses, ont subventionné mes études et ma recherche. Merci ainsi au Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS; bourse de maîtrise), à l'Institut de Recherche en Santé du Canada (IRSC; bourse Charles Best et Frederick Banting), à la Faculté des Études Supérieures et Post-doctorales (FESP; bourse d'excellence Hydro-Québec), et à la Faculté de Pharmacie (bourse de recrutement). Un tel soutien fait la différence.

# CHAPITRE 1 – IMMUNITÉ INNÉE ANTIVIRALE

## 1.1 CONTEXTE

Les vertébrés sont constamment exposés par contact direct, par ingestion et/ou par inhalation à d'innombrables micro-organismes ayant un potentiel pathogène. De manière à se protéger contre de telles affections, les mammifères comportent une série de défenses immunitaires leur permettant de prévenir certaines infections, et d'éradiquer ces agents infectieux. Globalement, le système immunitaire représente l'ensemble des cellules et des protéines visant à maintenir l'homéostasie cellulaire et corporelle en protégeant les différents tissus des micro-organismes étrangers, incluant les virus, les bactéries, les champignons, les parasites, mais aussi en participant à l'élimination des cellules dysfonctionnelles, telles que les cellules cancéreuses. Classiquement divisé en deux branches distinctes : l'immunité innée et celle adaptative, la réponse immunitaire représente la résultante d'un entrelacement serré entre ces deux types d'immunité. En fait, caractérisé par la présence endogène d'effecteurs, le système de l'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'hôte contre l'invasion de pathogènes et agit ainsi rapidement. D'un autre côté, l'immunité adaptative est impliquée dans la formation d'une mémoire immunologique, de même que dans l'élimination de pathogènes lors des phases plus tardives d'une infection (1). Ainsi, l'immunité adaptative se définit entre autres par la spécificité de sa réponse qui se développe par l'expansion clonale de lymphocytes arborant des récepteurs spécifiques à certains antigènes qui sont générés par un mécanisme aléatoire de recombinaison et d'hypermuation somatique de segments de gènes. Bien qu'elles soient souvent décrites séparément, l'immunité innée et celle adaptative sont plutôt mutuellement dépendantes; la présence de l'une favorise l'émergence de l'autre. Une anomalie dans l'un ou l'autre de ces systèmes se traduit donc en une vulnérabilité accrue de l'hôte aux infections (2, 3).

La capacité du système immunitaire inné à identifier et contrer la présence d'infections dépend de plusieurs mécanismes immuns complexes faisant intervenir l'activation de récepteurs, nommés récepteurs de reconnaissance de pathogènes

(PRRs; *pathogen recognition receptors*), qui reconnaissent de nombreuses molécules ayant des structures communes et invariables souvent référées en tant que motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs; *pathogen-associated molecular patterns*). L'importance centrale de ces PAMPs dans la virulence et la survie des pathogènes prévient donc l'émergence de résistances par simple mutation (4, 5). Les PRRs sont d'ailleurs en mesure de reconnaître une panoplie de PAMPs provenant de différentes classes de pathogènes microbiens, incluant les virus, les bactéries, les champignons, et les parasites. Les PAMPs les plus communs comprennent certains glucides (p. ex. lipopolysaccharide (LPS), mannose, glucanes), certains peptides (p. ex. flagelline), certaines composantes de la paroi cellulaire (p. ex. peptidoglycanes, acide lipothéichoïque, lipoprotéines, chitine), et certains acides nucléiques (p. ex. *DNA*, *dsRNA*, *ssRNA*, *5'-triphosphate RNA*) (4, 6-8). La reconnaissance de ces différentes structures dépend de nombreuses familles de PRRs, incluant les PRRs cellulaires et les PRRs de sécrétion. L'identification des PAMPs par ces PRRs représente un élément clé de l'immunité innée qui se compose de cellules immunitairement compétentes (l'immunité cellulaire innée) et de médiateurs solubles (l'immunité humorale innée). Interreliés, ces types d'immunité ont pour fonction initiale d'élaborer une réponse pro-inflammatoire locale afin de favoriser la reconnaissance des micro-organismes et l'activation éventuelle du bras adaptatif de l'immunité.

Les PRRs cellulaires, exprimés au niveau de la membrane cytoplasmique, des endosomes ou dans le cytoplasme, sont représentés par plusieurs catégories de protéines signalétiques et endocytiques menant à l'induction d'un état pro-inflammatoire critique pour le contrôle des infections et à la génération d'une réponse immunitaire adaptative spécifique contre les pathogènes (8). Ces PRRs incluent les *C-type lectin-like receptors* (CLRs), les *Toll-like receptors* (TLRs), les *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-*like receptors* (NLRs), les *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I)-*like receptors* (RLRs) et les différents senseurs d'ADN cytosoliques (7, 8). Au niveau des PRRs signalétiques, ce processus d'inflammation aiguë est initié par la présence d'un sous-groupe de leucocytes de garde, incluant les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, et les mastocytes. En effet,



exprimant des PRRs à même leur surface où à l'intérieur de compartiments intracellulaires, ces cellules sont en mesure de reconnaître la présence de pathogène et de relâcher plusieurs médiateurs incluant certaines cytokines, chimiokines, prostaglandines, leucotriènes et, dans le cas des mastocytes, l'histamine (5, 9). Par surcroît, les cellules épithéliales sont des composantes significatives de l'immunité innée et qui, en plus de leur rôle en tant que barrière physique, ont aussi la capacité, à l'instar des fibroblastes environnants, de reconnaître les signaux de danger et de produire des cytokines et des chimiokines. Ainsi, à travers la production de cytokines pro-inflammatoires incluant le *tumor necrosis factor* (TNF), l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et l'IL-6, et de chimiokines, tels que l'IL-8 et le *CC-chemokine ligand* (CCL)2, ces cellules induisent une vasodilatation locale et une augmentation de la perméabilité permettant l'extravasation et le recrutement au site de l'infection de neutrophiles, de monocytes/macrophages et de cellules dendritiques (8, 10-13). Collectivement, les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques représentent des phagocytes sur lesquelles d'autres PRRs dits endocytiques leur permettent d'internaliser les agents infectieux. En fait, la phagocytose est facilitée par les opsonines grâce à leur habileté à se lier à la fois aux parois cellulaires des micro-organismes et aux récepteurs des opsonines présents sur les phagocytes (5, 14, 15). Ces opsonines représentent l'immunité innée humorale et regroupent différents PRRs sécrétoires.

Les PRRs de sécrétion sont représentés par une multitude de composés en mesure de reconnaître et de favoriser l'élimination des agents infectieux, incluant les collectines (p. ex. lectine liant le mannose), les ficolines, les pentraxines (p. ex. la protéine C réactive), les défensines (p. ex.  $\beta$ -défensines), et d'autres membres du système du complément (16-19). Ces protéines de phases aiguës sont en fait sécrétées par les hépatocytes en réponse aux cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-6 (5). Leur concentration plasmatique s'élève donc rapidement et leur mobilisation au site de l'infection est favorisée par la perméabilité vasculaire accrue. Leurs fonctions majeures sont l'opsonisation des agents infectieux et l'activation du complément. Alors que les collectines et les ficolines activent la voie lectine

d'activation du complément, les pentraxines initient plutôt la voie classique d'activation (20-23). Le système du complément mène en soi à l'opsonisation des pathogènes, favorise le recrutement de phagocytes, dont les cellules présentatrices d'antigènes (APCs), et élimine directement les agents infectieux par la formation du complexe d'attaque membranaire (19, 23). L'endocytose des antigènes par les APCs représente en fait l'un des mécanismes clés initiant la présentation des antigènes, et le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative.

Outre la capacité à reconnaître les structures singulières des micro-organismes, il est maintenant bien reconnu que les PRRs sont aussi en mesure de reconnaître des ligands endogènes provenant de tissus endommagés afin d'induire une réponse inflammatoire. Par ailleurs, une dysfonction au niveau des mécanismes activateurs de l'immunité innée peut mener à de nombreuses maladies chroniques inflammatoires (24). En effet, en plus de son rôle important dans le contrôle des maladies infectieuses, l'immunité innée est aussi liée à une gamme de maladies telle que l'asthme, l'obésité, l'athérosclérose, l'hypertension et le cancer (25-31). De nombreuses maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques, la sclérodermie, le syndrome d'Aicardi-Goutières, le lupus érythémateux disséminé, le diabète de type 1 sont aussi reliées à l'activation aberrante des voies de signalisation de l'immunité innée (32-38). Une compréhension plus approfondie des processus soutenant les rôles physiologiques et pathologiques des déterminants moléculaires de la réponse immunitaire innée pourrait permettre la découverte rationnelle de nouvelles cibles thérapeutiques visant à contrôler le développement de ces maladies. La manipulation pharmacologique éventuelle des voies de signalisation de l'immunité innée offre ainsi de nombreuses opportunités thérapeutiques tant au niveau des maladies inflammatoires chroniques qu'au niveau de la modulation des maladies infectieuses.

La découverte de nouvelles cibles et le développement de nouveaux médicaments contre les maladies infectieuses demeurent des priorités étant donné l'émergence toujours grandissante de résistances. Les virus représentent un des principaux agents causals de ces maladies réfractaires aux traitements (39). Sources de morbidité et de mortalité importantes, les virus tels que le virus

d'immunodéficience humaine, les virus de l'influenza, les virus des hépatites, le virus de la rougeole, le rotavirus demeurent ainsi au centre des préoccupations de santé publique (40).

Les virus sont en fait des parasites intracellulaires obligatoires qui ne peuvent se répliquer qu'à l'intérieur d'une cellule hôte appropriée. Bien qu'ils contiennent un matériel génétique encodant certaines enzymes et autres protéines virales, ils dépendent majoritairement de facteurs et de mécanismes cellulaires pour leur réplication. Ainsi, afin de limiter sélectivement la croissance virale, les médicaments antiviraux ciblent normalement une composante spécifique d'un virus. Les antiviraux sont donc particulièrement sensibles aux mécanismes de résistance des virus. D'un autre côté, l'immunothérapie, qui vise à profiter des systèmes de défense innée de l'hôte pour combattre les infections, permet maintenant d'introduire un arsenal thérapeutique efficace contre plusieurs souches de virus (41, 42).

Ainsi, étant donnée l'importance des processus physiologiques et pathologiques de l'immunité innée dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques, de nombreuses études ont été accomplies au courant des dernières années afin de mieux comprendre les déterminants de la réponse antivirale innée.

## **1.2 LA RÉPONSE ANTIVIRALE INNÉE**

L'invasion d'un hôte par un virus déclenche une série de réponses immunitaires survenant à la suite d'une interaction entre une des composantes virales et les mécanismes de surveillance de l'hôte. Ces interactions hôte-agents infectieux sont généralement initiées par la reconnaissance de structures moléculaires conservées nommées PAMPs (1, 43, 44). La détection efficace des PAMPs dépend en fait de l'expression de PRRs qui induisent rapidement une réponse immunitaire innée de l'hôte via l'activation de différentes voies de signalisation qui culminent en l'expression de cytokines pro-inflammatoires, d'interférons (IFNs) et de chimiokines. Ces agents perturbent ensuite la dissémination et la réplication virale et mobilisent l'immunité adaptative (45). De ce fait, la réponse antivirale innée établit le pont entre les processus de reconnaissance des composantes virales exogènes et la mise en

branle d'une défense adaptée, faisant intervenir des cellules effectrices hautement spécialisées (46). De ce phénomène initial et prompt découle l'induction et la production d'une panoplie de gènes antiviraux, incluant les interférons.

### **1.2.1 LES INTERFÉRONS**

Les interférons sont des cytokines inductibles ayant des pouvoirs antiviraux variés et des propriétés de modulation cellulaire importante. En fonction de leur profil structurel, des récepteurs qu'ils engagent, et des activités cellulaires qu'ils régulent, les interférons sont classés en trois types : les interférons de type I, II et III (47-49). En effet, suivant la découverte des IFNs de type I au courant des années 1950 (50, 51), et des IFNs de type II en 1965 (52), deux groupes de recherche ont été en mesure d'identifier trois nouvelles cytokines qui seront ensuite regroupées sous le terme d'IFNs de type III (53, 54). Chez l'humain, les interférons de type I comportent de nombreux gènes, incluant ceux codant pour les IFNs- $\alpha$  (13 espèces), l'IFN- $\beta$  (1 espèce), l'IFN- $\varepsilon$  (1 espèce), l'IFN- $\kappa$  (1 espèce), l'IFN- $\omega$  (1 espèce) (55). Tous les IFNs de type I ne possèdent aucun intron, à exception de l'IFN- $\kappa$ , et se retrouvent sur le même locus au niveau du chromosome 9 (56). En ce qui concerne l'IFN de type II, un seul membre a été identifié, l'IFN- $\gamma$ . Ce dernier possède trois introns et se situe au niveau du chromosome 12. Les IFNs de type III, quant à eux, étaient originellement composés de trois gènes : IFN- $\lambda$ 1 (aussi IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (aussi IL-28A) et l'IFN- $\lambda$ 3 (aussi IL-28B) tous situés sur le chromosome 19 (57). Récemment, un quatrième membre, IFN- $\lambda$ 4, a été identifié, mais demeure une variante *frameshift* de l'IFN- $\lambda$ 3 et son rôle demeure grandement inconnu (58).

#### **1.2.1.1 Les interférons de type II**

L'IFN- $\gamma$ , membre à part entière de ce sous-type d'interféron, représente un agent clé de la défense immunitaire. En effet, cette cytokine, majoritairement produite par des cellules spécialisées du système immunitaire, possède de nombreuses activités immunomodulatrices qui sont particulièrement importantes pour la réponse immunitaire de l'hôte contre les infections microbiennes, mais aussi pour la protection

contre les infections virales (48, 59-62). D'ailleurs, l'IFN- $\gamma$  est sécrété par les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules *natural killer* (NK) et certains APCs telles que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (63-66). De ce fait, cet interféron agit de manière autocrine et paracrine et permet de stimuler, entre autres, l'immunité cellulaire innée en promouvant l'activité des cellules NK et l'activation des macrophages, et l'immunité cellulaire adaptative en favorisant l'essor des lymphocytes T auxiliaires (Th1) (67-69). D'autre part, l'IFN- $\gamma$  détient la capacité d'amplifier l'activité antivirale des IFNs- $\alpha$  et - $\beta$  dans certains contextes (70). De ce fait, les IFNs de type I et de type II agissent souvent de concert de manière à activer une myriade de réponses antivirales innées et adaptatives afin d'atteindre un état antiviral efficace et de favoriser l'élimination des pathogènes (71).

### **1.2.1.2 Les interférons de type I et de type III**

L'ensemble des interférons a un rôle majeur à jouer dans la protection de l'hôte contre les infections virales. Étant donnée leur activité antivirale marquée, les interférons de type I demeurent parmi les agents les mieux étudiés de leur classe. En fait, ces composés stimulent la formation d'un état antiviral puissant, et ce, rapidement suivant la reconnaissance d'un agent viral exogène (50, 72). Toutefois, formés de plusieurs membres, les IFNs de type I ne sont pas tous exprimés de la même manière. D'ailleurs, alors que la plupart des cellules somatiques, particulièrement les fibroblastes, sont en mesure de produire de l'IFN- $\beta$ , certaines cellules spécialisées de la lignée hématopoïétique, telles que les cellules dendritiques plasmocytoïdes, génèrent la majorité des IFNs- $\alpha$  circulant (73-75). Néanmoins, en tant que cytokines solubles, les IFNs de type I ont non seulement la capacité de provoquer la formation d'un état cellulaire antimicrobien des cellules infectées, ils peuvent aussi agir sur les cellules avoisinantes afin de limiter la diffusion des virus pathogènes. De plus, ils peuvent moduler la réponse immunitaire innée et adaptative en promouvant l'activation des cellules NK et la présentation des antigènes par les APCs (76-78). Par ailleurs, en activant le bras adaptatif de l'immunité, ils facilitent le développement d'une réponse humorale et cellulaire de haute affinité, et d'une

mémoire immunologique. Au-delà de son rôle en tant que cytokine antivirale, les IFNs de type I détiennent aussi une activité anti-proliférative grâce à leur capacité à induire l'autophagie et l'apoptose dans certains types cellulaires (79, 80). De ces faits, les interférons de type I se présentent en tant que protéines dont les effets pléiotropiques mènent à l'inhibition de la prolifération des pathogènes, à la stimulation de la présentation des antigènes et à la libération de l'hôte de l'infection (79).

À l'instar des interférons de type I, ceux de type III détiennent la capacité intrinsèque d'induire une activité cellulaire antivirale. En effet, malgré le fait que ces deux type d'IFNs ne partagent qu'une faible homologie de séquence, qu'ils soient régulés de manière quelque peu différente et qu'ils reconnaissent des récepteurs distincts, les voies de signalisation qu'ils empruntent et les gènes qu'ils régulent sont quasi-identiques (81). Ainsi, les effets engendrés demeurent en définitive hautement similaires (53). Par contre, une différence notoire réside dans le fait que contrairement aux IFNs de type I, qui sont reconnus par pratiquement toutes les cellules, seul un sous-groupe de cellules répond aux IFNs- $\lambda$ . Ce tropisme des IFNs de type III dépend en fait de l'expression particulière de la sous-unité IL28R $\alpha$  de son récepteur qui ne se retrouve que sur les cellules épithéliales du système gastro-intestinal, des voies respiratoires et du système reproducteur (82-84). Ce faisant, les IFNs de type III seraient plutôt habileté à contrôler une infection virale à la surface des muqueuses, alors que les infections systémiques seraient prises en charge par les IFNs de type I (85, 86).

La production d'IFNs représente donc un élément clé de la défense aiguë contre les infections virales. Néanmoins, la production incontrôlée de ces agents constitue un risque pour le développement de maladies auto-immunes (87). Le contrôle transcriptionnel de la production des IFNs représente donc un des facteurs importants limitant leur expression. Étant donné l'importance primordiale des interférons de type I dans la lutte systémique des virus, la suite de cette section discutera plus précisément des IFNs de type I.

### 1.2.1.2.1 Le contrôle transcriptionnel des interférons de type I : emphase sur l'archétype IFN- $\beta$

L'induction des gènes des IFNs de type I est régulée au niveau de la transcription. L'IFN- $\beta$  représente en fait le membre le mieux caractérisé. À l'état basal, les cellules n'expriment qu'une infime quantité d'IFNs- $\beta$  étant donné la présence constitutive de répresseurs transcriptionnel, incluant l'*IFN regulatory factor* (IRF)2; c'est lors d'une infection virale que les facteurs de transcription activateurs s'en trouvent désinhibés permettant ainsi le déplacement d'IRF2 et la synthèse de quantité cliniquement significative d'IFNs- $\beta$  (88). Les IFNs- $\beta$  ainsi sécrétés peuvent se lier à leurs récepteurs couplés aux protéines tyrosines kinases de manière à activer les voies de signalisation *Janus kinase* (JAK)/*signal transducers and activators of transcription* (STAT) qui mèneront à la production de nombreux gènes antiviraux (48, 89).

L'expression d'IFNs- $\beta$  requiert l'activation coordonnée et une liaison à l'ADN des facteurs de transcription *nuclear factor kappa-B* (NF- $\kappa$ B; (p50:p65)), IRF3 et IRF7, et *activator protein 1* (AP-1), formé de l'association hétérodimérique de l'*activating transcription factor 2* (ATF2) et de c-Jun (90). En fait, à la suite de la détection d'une infection virale, ces facteurs de transcription s'assemblent sur une région libre de nucléosome du promoteur de l'IFN- $\beta$  de manière à former un complexe multiprotéique, nommé *enhanceosome*, afin d'en stimuler l'expression (91). L'amplificateur (*enhancer*) de l'IFN- $\beta$  comprend au moins quatre domaines de régulation positive (PRD; *Positive Regulation Domains*), les PRDI-III, II et IV, auxquels viennent se lier respectivement les IRFs, NF- $\kappa$ B et AP1 (92-95). Toutefois, étant exprimés de manière constitutive, ces facteurs de transcription sont régulés par différents mécanismes prévenant ainsi une production aberrante d'IFNs- $\beta$ .

Tout d'abord, NF- $\kappa$ B est retenu dans le cytoplasme par son association avec les membres de famille *inhibitors of  $\kappa$ B* (I $\kappa$ B) (96). Nonobstant, suivant une infection, I $\kappa$ B est phosphorylé par le complexe kinase I $\kappa$ B (IKK), menant ainsi à son ubiquitination et à sa dégradation subséquente par le protéasome. Ceci libère et permet la translocation d'NF- $\kappa$ B au noyau (97). D'autre part, l'activité

transcriptionnelle d'IRF3 et d'IRF7 est régulée par plusieurs modifications post-traductionnelles suivant une infection virale. En effet, résidant initialement dans le cytosol, leur phosphorylation par les *IKK-related kinases*, *TANK-binding kinase 1* (TBK1) et  $IKK\epsilon$ , au niveau de leur domaine C-terminal induit un changement conformationnel permettant à IRF3 et/ou à IRF7 de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser. Ces formes dimériques peuvent ensuite être importées dans le noyau où, une fois associées à ses coactivateurs, elles induisent la transcription des gènes IFNs de type I (98, 99). IRF1 et IRF5 seraient aussi en mesure de jouer un rôle positif dans l'induction des IFNs- $\beta$  dans certains types cellulaires et dans des conditions précises (100). Contrairement à NF- $\kappa$ B et aux IRFs, AP-1 est présent de manière constitutive dans le noyau et détient la capacité de lier l'ADN, et ce, malgré l'absence de stimulation cellulaire. Toutefois, AP-1 demeure incapable d'induire la transcription sans que son domaine d'activation soit préalablement phosphorylé par une kinase de la voie des MAPK (101-104).

À la suite d'une infection virale, la création d'un environnement spécifique et stable favorisant la formation d'un *enhanceosome* efficace nécessite la liaison conjointe de ces activateurs de la transcription avec la *high mobility group AT-hook 1a* (HMGA1a) (105-107). Suivant la formation du *enhanceosome*, le recrutement séquentiel des histones acétyltransférase (HAT) incluant la *general control of amino-acid synthesis 5* (GCN5), de la *CREB-binding protein* (CBP) et de son paralogue p300 permettent l'acétylation des histones H3 et H4 d'un nucléosome bordant l'amplificateur du gène *Irf1* (108, 109). Le remodelage de la chromatine effectué par le complexe SWI/SNF suivant l'acétylation de ce nucléosome, qui masque normalement la boîte TATA et le site d'initiation de la transcription, permet de libérer le promoteur. Ceci facilite ainsi la liaison subséquente du facteur de transcription II D (TFIID), un élément clé préalable à la transcription de l'IFN- $\beta$  (91, 110).

En ce qui a trait aux IFNs- $\alpha$ , ces derniers présentent une architecture de régulation similaire, mais beaucoup plus simple. En fait, bien que chacun des IFNs- $\alpha$  peuvent être régulé de manière distincte et indépendante, les facteurs de transcription NF- $\kappa$ b et AP-1 ne semblent avoir aucun rôle direct (111). Toutefois, au



même titre que l'IFN- $\beta$ , les membres de la famille des IRFs demeurent essentiels. En effet, des rôles pour IRF1, IRF3, IRF4, IRF5, IRF7 et IRF8 ont été documentés dans l'induction des IFN- $\alpha$ ; IRF3 et IRF7 y jouent un rôle prépondérant universel, alors que les autres IRFs influencent plutôt la production d'IFNs dans certains types cellulaires (111-113).

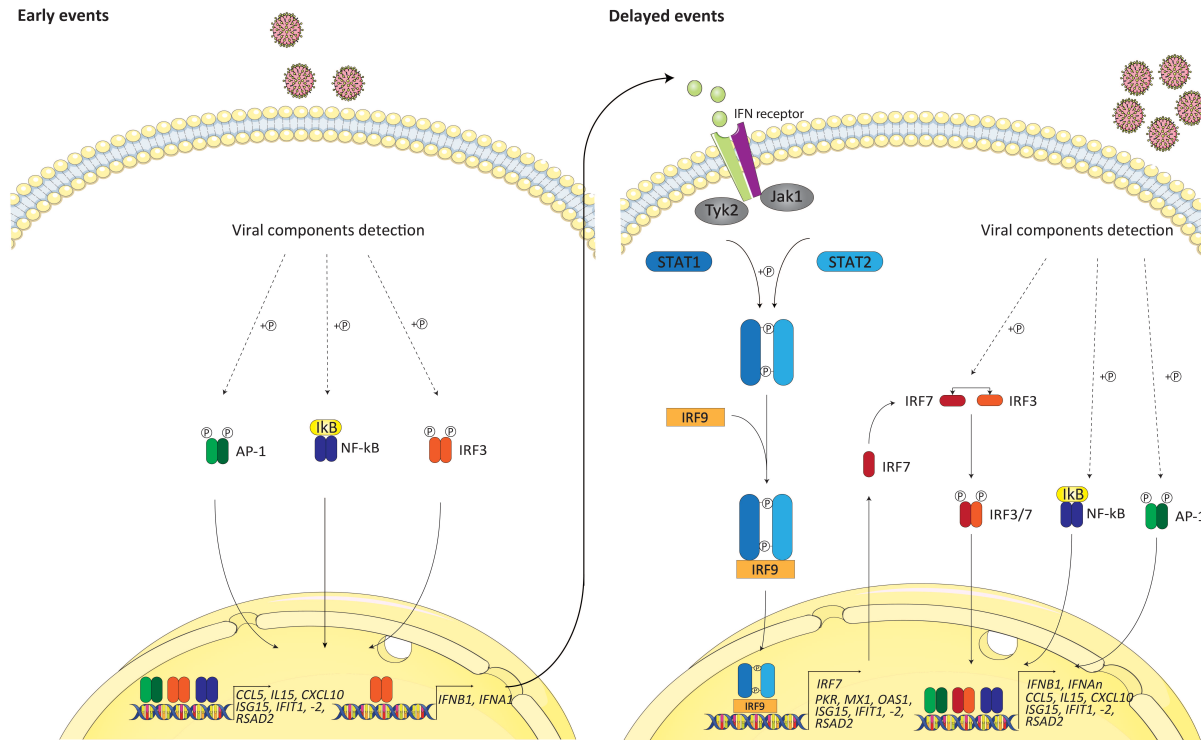
#### 1.2.1.2.2 La signalisation des interférons de type I

La production et l'excrétion initiale des IFNs- $\alpha$  des IFNs- $\beta$  par la cellule permet leur liaison et l'activation subséquente des récepteurs à interférons  $\alpha/\beta$  (IFNARs) de manière autocrine/paracrine afin d'initier une boucle de rétroaction positive résultant en une production accrue d'IFNs de type I (114). En fait, tous les IFNs de type I mènent à l'hétérodimérisation de leur récepteur formé des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 afin d'y favoriser l'apposition respective de deux kinases, la *tyrosine kinase 2* (TYK2) et JAK1 (89, 115-117). Suivant la dimérisation causant le rapprochement de ce complexe multiprotéique, ces tyrosines kinases subissent une série d'autotransphosphorylation menant à leur activation, de même qu'à la phosphorylation des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2. La phosphorylation de la Tyr466 de l'IFNAR1 par TYK2 initie le recrutement de la protéine STAT2 qui interagit avec le récepteur grâce à son domaine *Src homology region* (SH2) (118, 119). Il s'ensuit une phosphorylation au niveau de la Tyr690 de STAT2 par TYK2 (89). Étant faiblement associé à STAT2, STAT1 se fait quant à elle phosphoryler par JAK1 sur la Tyr701 (89, 120). Ce faisant, l'interaction entre ces deux protéines s'en trouve hautement stabilisé. Parallèlement, l'acétyltransférase cytosolique CBP est recruté à la sous-unité IFNAR2 phosphorylée afin de catalyser son acétylation sur la Lys399 (121). Dès lors, IRF9 y est recruté permettant l'association hétérotrimérique entre STAT1, STAT2 et IRF9 formant le complexe transcriptionnel ISGF3 (122). L'acétylation de ces trois membres par CBP semble d'ailleurs importante pour la stabilisation et l'activité d'ISGF3 (121). Grâce à son domaine de liaison à l'ADN, IRF9, au même titre que les autres membres de la famille des IRFs, reconnaît l'élément de réponse *IFN-stimulated response element* (ISRE) des gènes qu'ils régulent, incluant des centaines

d'*IFNs-stimulated genes* (ISGs) dont les rôles varient entre effecteur de la défense, régulateurs négatifs et régulateurs positifs de la réponse antivirale.

À ce modèle simplifié de l'activité classique des IFNAR s'ajoute une déclinaison d'un nombre grandissant de complexes pouvant être formés suivant leur activation. En fait, dépendamment du type cellulaire sur lequel ils agissent, les IFNs de type I ont la capacité d'activer les sept STATs (STAT1-7) formant ainsi une myriade d'homodimères ou d'hétérodimères qui, lorsqu'ils se lient à leur élément de réponse *gamma activated site* (GAS), ont des activités biologiques variables (123). D'autre part, les nuances de la signalisation des IFNs de type I peuvent aussi s'expliquer par la capacité de leurs récepteurs à mobiliser d'autres kinases que les JAKs (p. ex PI3K, p38, ERK et JNK) qui mènent à l'activation de facteurs de transcription différents des STATs (p. ex. NF- $\kappa$ B, AP-1, IRF1, IRF4, IRF8, PU.1) (123). En agissant conjointement avec les STATs au niveau du promoteur, ces facteurs de transcription peuvent contribuer à la production de gènes distincts ou, inversement, peuvent mener à la production de gènes indépendamment des STATs (124). Cet effet pourrait d'ailleurs expliquer la différence entre le profil d'expression génétique de différents types cellulaires, mais aussi entre les sous-types d'IFNs de type I (123, 125). De plus, l'activation parallèle de différentes enzymes cellulaires par certaines cytokines peut aussi influencer la phosphorylation des tyrosines kinases JAKs et l'activation des STATs. C'est la combinaison de ces différents schèmes transcriptionnels impliquant de nombreux facteurs de transcription qui alloue une induction spécifique différentielle de gènes menant à des réponses biologiques variées et parfois paradoxales. Ainsi, en fonction de quels facteurs de transcription sont activés à travers chaque type cellulaire, les IFNs de type I ont la capacité de promouvoir soit la survie et la prolifération, soit l'apoptose et l'inhibition de la croissance (126-129). C'est d'ailleurs grâce à leur implication dans plusieurs processus biologiques que les IFNs de type I ont pu être utilisés dans le traitement de certaines infections virales chroniques, incluant celles causées par le cytomégalo virus et les virus de l'hépatite B et C et certains virus de la famille des *Herpesviridae*, mais aussi dans le traitement de nombreux cancers, incluant certains cancers hématologiques (leucémies, lymphomes) et certaines tumeurs (mélanome,

carcinome rénal, sarcome de Kaposi) (130, 131). Au demeurant, les voies de signalisation des IFNs de type I suivant une infection virale mènent ultimement à l'induction de gènes encodant pour des ISGs ayant divers rôles (chapitre 1, figure 1).



**Figure 1 : Les éléments précoces et tardifs de la réponse antivirale innée.**

L'activation des différentes voies de signalisation suivant la reconnaissance des composantes virales mène à l'activation des facteurs de transcription IRF3, AP-1 et NF-κB de manière à stimuler la production des IFNs de type I et de différents gènes antiviraux, dits précoces. Une fois sécrété, les IFNs de type I agissent de manière autocrine et paracrine en se liant à leurs récepteurs spécifiques. Leur liaison active la voie JAK/STAT résultant en la formation du facteur de transcription hétérotrimérique, ISGF3, composé de STAT1, de STAT2 et d'IRF9, qui permet la production d'IFN7. En réponse à une infection virale, IRF7 contribue conjointement avec IRF3 à l'amplification de la réponse antivirale en favorisant la production plus tardive d'IFNs de type I et de différents gènes antiviraux. À noter que le facteur de transcription AP-1 se trouve d'emblée au niveau du noyau. Le modèle a été créé en utilisant les gabarits de *Servier Medical Art* sous une licence non restrictive CCBY 3.0 (<https://smart.servier.com/>).

### 1.2.1.3 Les ISGs

Lors d'une infection virale, la réponse initiale, incluant la production d'IFNs de type I et de certains ISGs (p. ex. ISG15, ISG54, ISG56 et *virus inhibitory protein*, *endoplasmic reticulum-associated*, *IFN-inducible protein* (Vipérine)), est stimulée par

l'activation des facteurs de transcription tels qu'IRF3, NF- $\kappa$ B et AP-1 (chapitre 1, figure 1). Cette réponse initiale représente la réponse antivirale précoce. De manière intéressante, l'avènement des puces à ADN a non seulement permis l'identification des gènes induits lors d'une infection virale et ceux répondant spécifiquement aux interférons, mais aussi ceux stimulés par la seule présence d'une forme activée d'IRF3, IRF3(5D) (132). De plus, une étude faisant intervenir des techniques de délétion génétique a permis d'identifier les gènes dont la transcription suivant une infection virale est indépendante, influencée ou entièrement dépendante de l'activation d'IRF3. ISG54 et Vipérine représentent en fait des exemples de protéines dont l'induction dépend absolument de l'activation d'IRF3 (133, 134). Une fois sécrétés, les IFNs agissent de manière autocrine/paracrine afin de permettre la formation d'ISGF3 qui se transloque au noyau afin de lier les promoteurs de la multitude d'ISGs qu'il régule. Ceci mène ainsi à la production d'un protéome regroupant des centaines de candidats qui participent directement aux effets antiviraux, antiprolifératifs et immunomodulateurs des IFNs (135, 136). La vague de protéines antivirales ainsi produites, dites tardive, inclue *dsRNA activated kinase* (PKR), *Myxovirus resistance GTPase* (Mx), *2'-5'oligoadenylate synthase* (OAS), *RNA-specific adenosine deaminase-1/2* (ADAR1/2), RNase L, IRF1 et IRF7 dont les effets antiviraux ont été décrits (48, 137, 138). Certains de ces gènes détiennent la capacité d'amplifier la réponse signalétique afin de contrer la réplication virale et de rétablir l'homéostasie systémique. TLR3, TLR7, RIG-I, MDA5 et IRF7 en sont des exemples qui seront décrits dans les sections suivantes (139). L'expression accrue de ces protéines de régulation positive contribue à la boucle d'amplification de production des IFNs de type I et des ISGs caractérisant la réponse antivirale innée tardive (chapitre 1, figure 1) (137). Induites de manière soutenue durant une infection virale, ISG15, ISG54, ISG56 et Vipérine représentent en fait des protéines ayant des rôles clés bien caractérisés dans le développement d'une réponse antivirale adéquate.

Suivant une infection virale, l'expression abondante et rapide d'ISG15 marque un événement important dans la défense et la survie de l'hôte (140, 141). En fait, des études ont démontré que des souris n'ayant pas la capacité d'exprimer ISG15 étaient

plus à risque de mortalité suivant une infection virale (142, 143). Alors que les déterminants moléculaires précis de tels effets demeurent incompris, l'implication d'ISG15 dans une multitude de processus découlant de sa conjugaison aux protéines virales et de l'hôte ou provenant de sa signalisation sous sa forme non conjuguée démontre la variété de ses effets régulateurs de la réponse antivirale (144). Ayant une structure similaire à l'ubiquitine, ISG15 peut être conjugué à de nombreuses protéines cibles grâce à une cascade enzymatique qui est composée des enzymes E1, E2 et E3. Les E3 ligases *tripartite motif containing protein 25* (TRIM25) et HERC5 semblent être en mesure de catalyser l'ISGylation de certaines protéines (145, 146). Situé normalement aux abords des polysomes, HERC5, la E3 ligase prédominante catalysant l'ajout d'ISG15 à ses substrats, favorise l'ISGylation préférentiel des protéines nouvellement traduites (146, 147). Cette conjugaison concomitante à la traduction admet d'ailleurs que l'ajout d'ISG15 aux protéines virales et aux ISGs est un événement important. À titre d'exemple, l'ajout post-traductionnel d'ISG15 à certaines composantes virales comme la *non-structural protein 1* (NS1) du virus de l'influenza A (IAV), la protéine formant la capsid du virus du papillome humain (HPV) et la protéine Gag du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) prévient leur fonctionnement normal et inhibe ainsi leurs pouvoirs infectieux (147-150). Également, de nombreuses études ont démontré le rôle de l'ISGylation de nombreuses protéines de l'hôte impliqué dans l'instauration d'une réponse antivirale adéquate. Par exemple, l'ISGylation d'IRF3 permet sa stabilisation et ainsi, une réponse aux interférons plus robustes (151, 152). D'autre part, l'ajout d'ISG15 sur PKR permet d'augmenter son activation menant à un accroissement de la phosphorylation eIF2 $\alpha$  qui inhibe, par conséquent, la traduction des ARNm viraux et cellulaires de manière à limiter l'infection (153). Finalement, la forme non conjuguée d'ISG15 peut être sécrétée et pourrait être responsable d'une production accrue d'IFN $\gamma$  par de multiples types cellulaires (144, 154, 155).

Les protéines ISG54 et ISG56, quant à elles, font partie de la même famille et sont aussi connues sous le nom d'*interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats* (IFIT)2 et IFIT1, respectivement. Grâce à leurs motifs tétratricopeptides

responsables de leur interaction interprotéique, ISG54 et ISG56 inhibent la formation du complexe ternaire d'initiation de la traduction eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub> en se liant à la sous-unité eIF3e du complexe multiprotéique eIF3 (156, 157). Par ailleurs, ISG54 lie aussi la sous-unité eIF3c prévenant par le fait même la formation du complexe de préinitiation 48S (158). Ce faisant, ces composés ont la capacité de restreindre grandement la traduction cellulaire (159).

Vipérine possède aussi une puissante activité contre de nombreux virus. Bien que son mode d'action demeure imprécis, Vipérine, en perturbant la formation de radeaux lipidiques (*lipid rafts*), est en mesure d'inhiber l'émission des particules virales de certains virus dont le virus de l'influenza A. Pour atteindre un tel effet, Vipérine lie et inhibe la *farnesyl diphosphate synthase* (FPPS), une enzyme responsable de la biosynthèse du cholestérol et des terpénoïdes (160, 161).

La capacité de ces protéines et l'apport considérable d'une pléthore d'autres ISGs à contrer une infection virale découlent toutefois d'une étape initiale primordiale: la reconnaissance des composantes virales.

## **1.2.2 RECONNAISSANCE DES VIRUS**

Les virus sont des parasites intracellulaires qui ne peuvent se répliquer qu'à l'intérieur d'une cellule hôte appropriée. Les virus représentent ainsi un agencement de molécules biologiques qui leur confère leur forme particulière et infectieuse dont l'unité de base est nommée virion. Ces virions sont minimalement composés d'une molécule d'acides nucléiques (nucléoïde) revêtue d'une capsidie protéique protectrice. Par ailleurs, certains virus détiennent une membrane externe, provenant des cellules hôtes, et qui forme ainsi une enveloppe glycoprotéique dont les constituantes sont à la fois d'origine virale et cellulaire. Généralement absentes des cellules saines, ces différentes composantes (p. ex. acides nucléiques viraux, protéines virales) représentent des PAMPs pouvant être détectées par le système de détection innée des cellules afin de stimuler la production de protéines antivirales, incluant les IFNs de type I. Dans la grande majorité des cas, la production des IFNs

de type I et des ISGs découle en fait de la détection d'acides nucléiques viraux par les PRRs endogènes.

Les acides nucléiques représentent des PAMPs bien adaptés pour la reconnaissance virale. En effet, puisque ces motifs moléculaires sont uniques et conservés à travers les micro-organismes d'une même classe, il devient beaucoup plus simple pour une cellule hôte de discriminer les composantes virales du soi. Aussi, étant donné que ces molécules détiennent une activité essentielle à leur réplication, un virus ne peut simplement muter pour prévenir leur détection (5).

Le discernement entre les acides nucléiques viraux de ceux de l'hôte s'opère grâce à la reconnaissance de certaines modifications chimiques et de certaines structures propres à l'ADN et à l'ARN viral. Aussi, la compartimentalisation sous-cellulaire des PRRs joue un rôle dans la reconnaissance spécifique des acides nucléiques viraux en les identifiant dans des endroits où les acides nucléiques de l'hôte sont normalement absents. Les PRRs pouvant reconnaître les acides nucléiques incluent les *Toll-like receptors* (TLR) endosomaux, les *RIG-I-like receptors* (RLR) cytoplasmiques, de même que la famille hétérogène de senseurs d'ADN (162).

### **1.2.2.1 TLR détectant les acides nucléiques**

La nomenclature des *toll-like receptors* (TLRs) provient en fait de l'holotype Toll identifiée initialement chez la Drosophile en tant que senseur permettant le développement d'une immunité antifongique (163). Depuis cette découverte, de nombreux autres homologues de Toll ont été découverts, particulièrement chez les mammifères. Les TLRs représentent donc une famille de récepteurs à un passage transmembranaire (TM) qui sont retrouvés principalement dans les cellules compétentes du système immunitaire telles que les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (DC) (164). Signalant en tant qu'homodimère ou hétérodimère, tous les TLRs partagent certaines caractéristiques structurelles incluant la présence d'un domaine vésiculaire ou extracellulaire muni de nombreuses répétitions riches en leucines (LRR; *leucine-rich repeat*) responsables de la reconnaissance de certains PAMPs spécifiques, d'un domaine TM déterminant leur localisation cellulaire et d'un

domaine cytoplasmique présentant un motif nommé *Toll/IL-1 receptor* (TIR) impliqué dans la reconnaissance des adaptateurs signalétiques en aval (165, 166). Alors que certains TLRs tels que les TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la surface de la membrane cytoplasmique afin de permettre la détection de composantes bactériennes et fongiques, les TLR3, 7, 8, 9 reconnaissent les acides nucléiques viraux au niveau des endosomes. Toutefois, bien que l'activation de tous ces récepteurs mène à la production de cytokines pro-inflammatoires, tels que l'IL-6 et le *tumor necrosis factor* (TNF) $\alpha$ , seuls les TLRs endosomaux, incluant les TLR3, 7, 8 et 9, sont en mesure de répondre aux acides nucléiques viraux résultant de manière à produire des IFNs de type I (162).

#### 1.2.2.1.1 TLR3 : la reconnaissance de l'ARNdb viral

Le TLR3 est un récepteur retrouvé majoritairement dans les cellules immunes incluant les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) et les macrophages. La sélectivité de liaison entre TLR3 et ses substrats découle de la présence de 23 LRRs au niveau de son domaine endosomal (167, 168). En fait, les intermédiaires de réplication ou de transcription des virus à ARNs ou à ADN, et l'ARNdb retrouvé directement dans le génome des virus à ARNdb représentent des ligands du TLR3 (162). Par ailleurs, l'ARNdb synthétique, l'acide polyinosinique:polycytidylique (poly(I:C)), a aussi été identifié en tant que molécule pouvant simuler une réponse antivirale en étant reconnu par TLR3. En fait, initialement identifié en tant que récepteur impliqué dans la reconnaissance du poly(I:C) et d'ARN génomique purifié de certains virus à ARNdb de la famille des *Réoviridae* (169), TLR3 a depuis été décrit comme senseur central de nombreux virus à ARNs incluant, le virus respiratoire syncytial (RSV; *respiratory syncytial virus*), le virus du Nil occidental (WNV; *West Nile virus*), le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV; *encephalomyocarditis virus*), le virus de la forêt de Semliki (SFV; *Semliki forest virus*) et le IAV (170-172). D'autre part, TLR3 joue aussi un rôle dans la détection d'intermédiaires de réplication de virus à ADN tels que le virus de l'herpès simplex (HSV; *herpes simplex virus*)



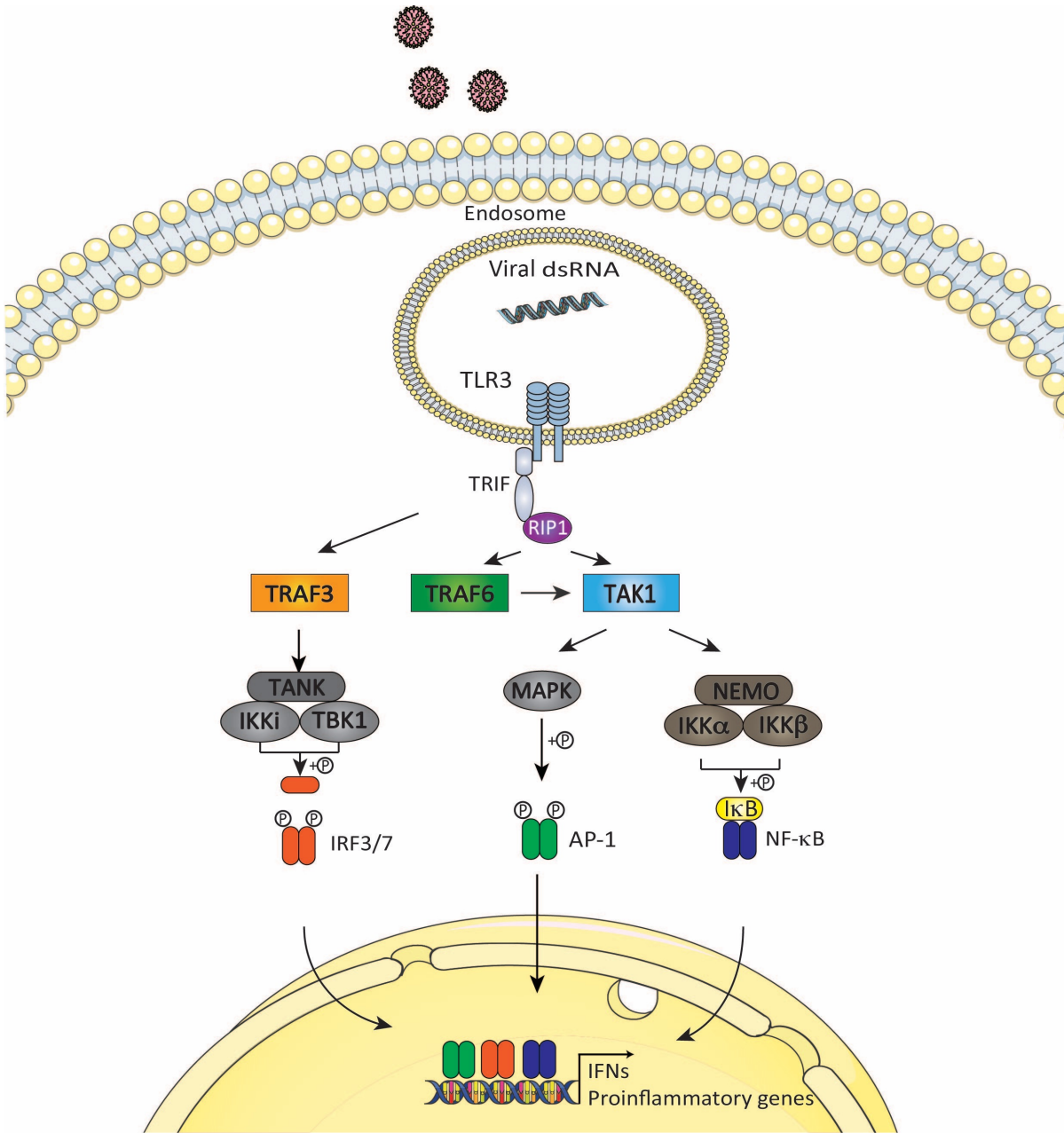
(173). L'activation de TLR3 mène au recrutement de nombreux partenaires de signalisation desquels découle la formation d'une défense antivirale efficace.

#### 1.2.2.1.1.1 Signalisation du TLR3

Le TLR3 comprend une particularité par rapport aux autres membres de la famille des TLRs en ce sens que son domaine TIR contient une alanine plutôt qu'une proline favorisant ainsi le recrutement d'un adaptateur distinct : le *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$*  (TRIF) (174-176). En fait, lorsque TLR3 reconnaît un de ses ligands, il recrute et lie TRIF grâce à une interaction homotypique entre leur domaine TIR respectif (177). Par ailleurs, en plus du domaine TIR, TRIF comporte les domaines nommés *TRAF6-binding domain* (T6BD) et *receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif* (RHIM). Ainsi, suivant son recrutement au TLR3, TRIF lie et active TRAF6, une E3 ubiquitine ligase (178, 179). Ceci mène à son autopolyubiquitination en Lys63, de même que celle d'autres substrats, dont la *transforming growth factor-activated protein kinase* (TAK)1 et la protéine *NF- $\kappa$ B essential modifier* (NEMO) (180, 181). C'est en fait la liaison des *TAK1-binding protein* (TAB)2 et TAB3 au domaine ubiquitiné de TRAF6, qui orchestre le rapprochement de TAK1 résultant en son activation. La liaison de TRIF à RIP1 grâce à son domaine RHIM facilite aussi le rapprochement et l'activation de TAK1 (179). La signalisation initiée par TAK1 résulte en l'activation de NF- $\kappa$ B et d'AP-1 en faisant intervenir deux voies distinctes impliquant le complexe IKK et la voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), respectivement (182). Suivant sa liaison au complexe IKK, formée de NEMO, et des kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , TAK1 permet l'activation de ces dernières afin de mener à la phosphorylation et à la dégradation subséquente par le protéasome d'I $\kappa$ B (183). Ainsi libéré, NF- $\kappa$ B peut se transloquer au noyau afin de stimuler la production des gènes qu'il régule, incluant IP10, IL6 et IL12. Par ailleurs, TAK1, en phosphorylant les membres de la famille des MAPK kinases (MKK) incluant MKK3/6 et MKK4/7, mène à la phosphorylation activatrice des protéines kinases p38 et *c-Jun N-terminal kinase* (JNK). À leur tour, ces dernières

activent respectivement les facteurs de transcription ATF2 et c-Jun formant conjointement l'hétérodimère AP-1 (chapitre 1, figure 2) (183, 184).

D'un autre côté, TRIF a la capacité de lier et d'activer TRAF3 ce qui mène à l'activation du facteur de transcription IRF3 qui est un événement nécessaire à l'induction des IFNs de type I (178, 185). Pour ce faire, TRAF3 s'associe à la *TRAF-associated NF- $\kappa$ B activator* (TANK), qui a aussi la capacité de lier des kinases similaires aux IKKs, incluant la *TANK-binding kinase* (TBK1) et la protéine inductible IKK (IKKi ou IKK $\epsilon$ ). Ensuite, ces sérines/thréonines kinases sont en mesure d'activer IRF3 et/ou IRF7 en phosphorylant leur domaine C-terminal. La phosphorylation d'IRF3/7 permet en fait leur homo/hétérodimérisation, leur translocation au noyau, et l'activation des gènes présentant un élément de réponse ISRE dont celui des IFNs de type I (chapitre 1, figure 2).



**Figure 2 : La voie de signalisation de TLR3**

Suivant la reconnaissance des acides nucléiques viraux, TLR3, à travers le recrutement de son adaptateur TRIF, permet l'activation de multiples voies de signalisation résultant en l'activation des facteurs de transcription IRF3/7, AP-1 et NF-κB. Ce faisant, TLR3 amorce la production d'IFNs et de cytokines proinflammatoires. Le modèle a été créé en utilisant les gabarits de *Servier Medical Art* sous une licence non restrictive CCBY 3.0 (<https://smart.servier.com/>).

#### *1.2.2.1.2 TLR7/8 et TLR9 : la reconnaissance de l'ARNsb et de l'ADN viraux*

Les TLR7 et TLR8 sont des récepteurs structurellement similaires pouvant reconnaître l'ARNsb de nombreux virus. L'expression de ces récepteurs est limitée aux cellules immunes. Chez les humains, TLR7 est retrouvé dans les cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDCs) et les cellules B, alors que TLR8 est plutôt présent dans la lignée des cellules myéloïdes, incluant les monocytes, les macrophages et les cDCs (186, 187). Ces récepteurs ont initialement été démontrés comme senseurs de petits composés antiviraux dérivés de l'imidazoquinoline, tels que l'imiquimod et le resiquimod, dont la reconnaissance active une réponse immunitaire innée (188, 189). Ensuite, l'identification d'ARNsb riches en guanosine et uridine retrouvés dans le génome du VIH et de l'IAV en tant que ligands a permis d'apprécier le rôle de l'ARNsb génomique viral en tant que véritable ligand (190, 191). Depuis, une variété de virus à ARNsb a été identifié comme étant reconnu par les TLR7/8, incluant le virus Sendai (SeV), le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), le IAV, le virus coxsackie B, le virus de la dengue (DENV) (192-195).

TLR9, quant à lui, est exprimé principalement dans les compartiments endosomaux des pDCs et des cellules B. Initialement identifié en tant que senseur d'ADN contenant des dinucléotides CpG non méthylés, qui sont fréquemment observés dans les génomes bactériens, TLR9 a subséquemment été rapporté en tant que récepteur reconnaissant l'ADN viral provenant de nombreux virus tels que le virus de l'herpès simplex (HSV)1/2, le cytomégalovirus murin et certains adénovirus (196-198).

Détectant les acides nucléiques au niveau des endolysosomes, ces récepteurs participent ainsi à la production marquée d'IFNs de type I et de cytokines pro-inflammatoires à travers l'activation de voies signalétiques particulières communes.

### 1.2.2.1.2.1 Signalisation des TLR7/8/9 : une voie commune

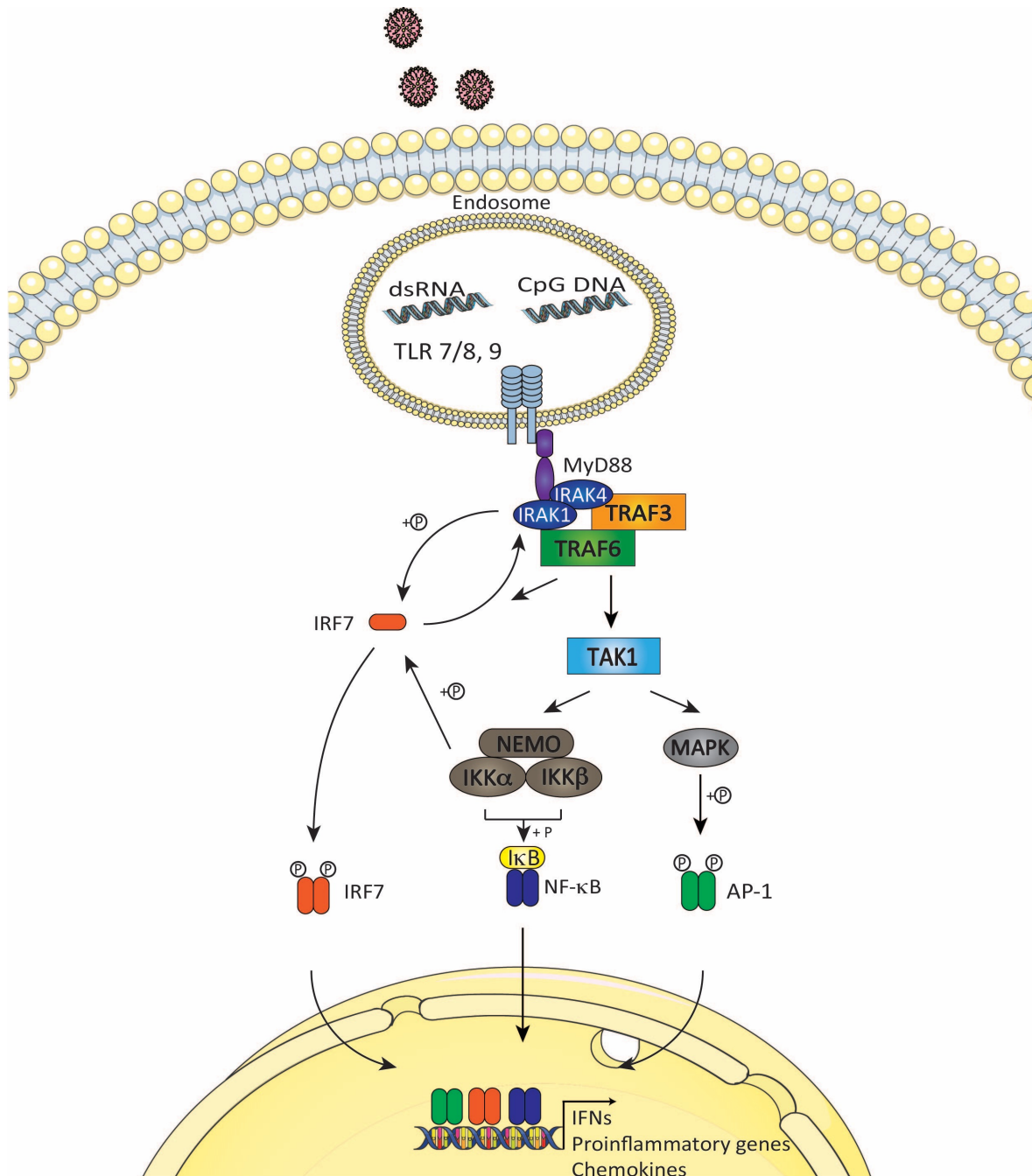
Les TLR7/8 et 9 transmettent leurs signaux grâce au recrutement de l'adaptateur *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) grâce à la liaison entre leur domaine TIR respectif. Ce faisant, en réponse à une infection virale dans les pDCs, les TLRs 7 et 9 utilisent, contrairement à TLR3, une voie de signalisation indépendante de TRIF afin de produire de larges quantités d'IFNs de type I (199, 200). La production de ces IFNs suivant l'activation de ces TLRs dépend de l'activation séquentielle des protéines *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK)4 et IRAK1, TRAF6, TRAF3 et IKK $\alpha$  (185, 200-203). En activant de nombreuses voies de signalisation, ce complexe multiprotéique permet la production de cytokines pro-inflammatoires, et des IFNs de type I.

Plus précisément, MyD88 contient aussi un *death domain* (DD) qui lui permet d'interagir avec ses effecteurs en aval, IRAK4 et IRAK1/2. Cette interaction permet l'activation d'IRAK4 qui phosphoryle IRAK1 et IRAK2 orchestrant ainsi le recrutement de TRAF6 et de TRAF3. Possédant une activité E3 ubiquitine ligase, ces enzymes mènent à l'activation de nombreuses voies de signalisation complémentaires (201, 204-207). De manière intéressante, les pDCs expriment de manière constitutive IRF7 ce qui permet aux TLR7 et TLR9 d'induire rapidement la production d'IFNs suivant une infection virale. En fait, la présence TRAF6 et de TRAF3 permet l'ubiquitination et le recrutement d'IRF7 au complexe multiprotéique dont ils font partie afin de favoriser la phosphorylation activatrice d'IRF7 par IRAK1 (200, 204, 208). De plus, la phosphorylation d'IRF7 par IKK $\alpha$  favoriserait l'activité transcriptionnelle d'IRF7 et ainsi, la production d'IFNs de type I (202). Par ailleurs, il semblerait que la kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) soit impliqué dans la pleine activation d'IRF7 dépendante de MyD88 (209).

Parallèlement à l'activation d'IRF7, TRAF6 détient aussi la capacité de mener à l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B et de la production concomitante de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Suivant son recrutement à IRAK1, TRAF6 orchestre sa propre polyubiquitination en Lys63, de même que celle d'autres substrats, incluant la kinase TAK1 et la protéine adaptatrice

NEMO. À l'instar du TLR3, la liaison de TAB2 et de TAB3 au domaine ubiquitiné de TRAF6 engage le recrutement de TAK1, qui, une fois activé, permet l'activation de NF- $\kappa$ B par les IKKs et d'AP-1 par la voie des MAPK tel que décrit précédemment à la section 1.2.2.1.1.1 (chapitre 1, figure 3).

La reconnaissance des virus à travers les TLRs représente ainsi une étape clé dans la formation d'une réponse antivirale innée. Toutefois, puisque les TLRs ne sont exprimés fortement qu'à l'intérieur des cellules spécialisées de l'immunité innée telles que les pDCs, les cDCs, les monocytes ou les macrophages, la plupart des autres types cellulaires dépendent plutôt de récepteurs cytosoliques afin de reconnaître une invasion virale, incluant les RLRs (210).



**Figure 3 : La voie de signalisation des TLR7, 8 et 9**

Suivant la reconnaissance de leurs ligands, les TLR7, 8 et 9 permettent, grâce à leur capacité de recruter les adaptateurs IRAK1 et 4, l'activation de différentes voies de signalisation menant à l'activation des facteurs de transcription IRF7, NF- $\kappa$ B et AP-1. Ceci induit la production subséquente d'IFNs, de cytokines proinflammatoires et de chimiokines. Le modèle a été créé en utilisant les gabarits de *Servier Medical Art* sous une licence non restrictive CCBY 3.0 (<https://smart.servier.com/>).

### 1.2.2.2 RIG-I-like receptors (RLRs)

Alors que les TLRs endosomaux représentent bel et bien un système efficace dans la détection de virus dans les cellules immunitaires phagocytaires, leur expression variable d'un type cellulaire à l'autre et leur localisation limitent toutefois la détection de particules virales ayant atteints le compartiment cytosolique. En effet, par mécanisme de fusion membranaire, certains virus enveloppés sont en mesure de libérer leur contenu directement dans le cytoplasme. De plus, d'autres virus, en se répliquant dans la cellule, font intervenir des intermédiaires cytoplasmiques d'ARNdb qui peuvent être reconnus par le système de défense antiviral. Ainsi, certaines études ont démontré la présence d'autres senseurs cytosoliques qui inspectent ce compartiment afin d'induire une réponse aux IFNs de type I, et ce, indépendamment des TLRs (211-213). Ces mécanismes alternatifs de détection virale font intervenir les membres de la famille des hélicases à ARN comportant un domaine DExD/H, incluant les protéines cytoplasmiques RIG-I et *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5). Avec la protéine *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2), RIG-I et MDA5 représentent la famille des RLRs (aussi *RIG-I-like helicases* (RLH)) (214). Cette famille est ainsi regroupée étant donné leur homologie structurelle dont la caractéristique commune majeure est la présence d'un domaine DExD/H essentiel dans la reconnaissance de l'ARN viral. Toutefois, alors que LGP2 a un rôle dans la régulation de la réponse antivirale, seuls RIG-I et MDA5 sont en mesure d'amorcer une réponse signalétique menant à la production de protéines antivirales (214, 215).

#### 1.2.2.2.1 RIG-I et MDA-5 : les sentinelles cytosoliques signalétiques

Les RLRs sont des protéines dont l'expression est ubiquitaire. Outre les pDCs dans lesquelles la réponse antivirale dépend grandement des TLRs, les autres types cellulaires, incluant les fibroblastes et les cDCs, comptent plutôt sur la présence des RLRs (RIG-I et MDA-5) afin de stimuler l'activation des gènes antiviraux (216). Ces protéines sont présentes dans le cytosol et ont été initialement identifiées en tant que senseurs de virus à ARN dont la spécificité de détection n'est pas tout à fait redondante. En effet, RIG-I et MDA5 partagent certains ligands, mais détiennent



aussi des capacités de reconnaissance distinctes (217). Plus précisément, RIG-I est un senseur pour les virus à ARN appartenant aux *Paramyxoviridae* (p. ex. SeV, virus de la maladie de Newcastle (NDV)), aux *Orthomyxoviridae* (p. ex. virus de l'influenza), aux *Rhabdoviridae* (p. ex. VSV), et aux *Flaviviridae* (p. ex. virus de l'hépatite C (HCV), virus de l'encéphalite japonaise (JEV)) (217). D'autre part, RIG-I serait aussi en mesure de reconnaître de courts ARNdb, de même que les petits segments du composé synthétique d'ARNdb, le poly(I:C) (218, 219). De son côté, MDA5 reconnaît plutôt les *Picornaviridae* tel que l'EMCV, le virus de Theiler et le Mengovirus, de même que les *Noroviridae* et les longs fragments de poly(I:C) (217, 220). À l'instar de RIG-I, MDA5 est aussi en mesure de reconnaître l'ARNdb des *Reoviridae*, des *Flaviridae* (p. ex. le WNV, le DENV) et des *Arenaviridae* (p. ex. le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)) (217, 219, 221, 222). Par ailleurs, bien que RIG-I ait été identifié en tant que récepteur impliqué dans la reconnaissance des *Paramyxoviridae* (p. ex. SeV), il a été démontré que les protéines virales de ces virus antagonisent spécifiquement la signalisation initiée par MDA5 (223, 224). Similairement, les *Picornaviridae* (p. ex. ECMV) cible RIG-I de manière à provoquer sa dégradation, admettant un rôle possible de ce PRR dans la reconnaissance de cette famille de virus (225). Ceci admet ainsi que MDA5 et RIG-I partageraient davantage de ligands qu'initialement apprécié (226).

De manière à distinguer l'ARN viral du soi, RIG-I reconnaît spécifiquement la modification 5'-triphosphate (5'-PPP) qui survient lors dans la synthèse d'ARN viral; le processus normal de maturation co-transcriptionnel de l'ARN cellulaire, impliquant la formation d'une coiffe 5', prévient le maintien des extrémités 5'-PPP de l'ARN endogène (227). Tel que ci-haut mentionné, les *Picornaviridae* expriment la protéine virale VPg qui se lie de manière covalente à l'extrémité 5' de leur ARN et empêche ainsi leur reconnaissance par RIG-I. Toutefois, ces virus demeurent reconnus par MDA5 (227, 228). De plus, certains virus, tels que le virus Hantaan, le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo et le virus de la maladie de Bornera auraient la capacité d'éliminer leur groupement 5'-PPP afin d'éviter leur reconnaissance par RIG-I (229).

Tel que susmentionné, les RLRs détiennent une structure commune hautement conservée qui inclue un domaine hélicase DExD/H central, mais aussi un domaine C-terminal de liaison à l'ARN (CTD; *C-terminal RNA binding domain*) responsable de la détection des acides nucléiques viraux cytoplasmiques (230, 231). Par ailleurs, RIG-I et MDA5 présentent deux *caspase recruitment domains* (CARDs) qu'ils arborent au niveau de leur extrémité N-terminale et qui sont responsables de leur interaction avec les protéines adaptatrices et effectrices impliquées dans la signalisation en aval (218, 232). Le paradigme d'activation de RIG-I admet qu'en absence de ligands, ce dernier se retrouve dans une conformation monomérique autoinhibitrice. En effet, la présence d'un domaine répresseur (RD) à même son CTD, qui se replie sur les CARDs de manière à les masquer et à les rendre inaccessibles, prévient RIG-I d'activer les cascades de signalisation à l'état basal (233). C'est en fait la liaison d'un ARN viral au niveau du CTD et du domaine hélicase de RIG-I qui induit un changement conformationnel dépendant de l'ATP afin d'exposer les CARDs. MDA-5, quant à lui, ne contient pas de RD en son extrémité C-terminal et ne démontre ainsi aucune auto-inhibition. De son côté, LGP2 affiche aussi un RD en C-terminal, mais l'absence de domaine CARD prévient l'activation de molécules en aval (231, 233). Malgré le fait qu'une étude ait proposé un rôle positif dans la réponse antivirale, LGP2 a été décrit majoritairement comme un régulateur négatif de la signalisation en inhibant la production des gènes antiviraux suivant une infection virale (234, 235). Pour ce faire, plusieurs mécanismes d'interférences par LGP2 ont été décrits. Tout d'abord, LGP2 est en mesure de séquestrer les substrats d'ARN afin de prévenir l'activation de RIG-I et de MDA5 (235, 236). De plus, LGP2 interfère avec la signalisation de RIG-I en bloquant directement son oligomérisation activatrice et, indirectement, en perturbant l'activation de *mitochondrial antiviral signaling adaptor* (MAVS) (237). Ainsi, alors que LGP2 détient un rôle dans la régulation de la réponse antivirale, seuls RIG-I et MDA5 sont en mesure d'initier une réponse signalétique menant, entre autres, à la production de protéines antivirales.

### 1.2.2.2.1.1 Voies de signalisation des RLRs

La reconnaissance des ligands respectifs de RIG-I et MDA5 provoque une cascade signalétique commune qui mène à l'activation des facteurs de transcription IRF3, NF- $\kappa$ B et AP-1. Exerçant un contrôle transcriptionnel de leurs gènes cibles, IRF3, NF- $\kappa$ B et AP-1 promeuvent la production des IFNs de type I, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et de protéines antivirales. La signalisation amorcée par les RIG-I et MDA5 s'opère grâce à la liaison homotypique entre leur premier domaine CARD à celui se trouvant au domaine N-terminal de leur adaptateur MAVS (aussi IPS1/CARDIF/VISA) localisé au niveau de la membrane externe des mitochondries, des peroxyosomes et de la *mitochondria-associated ER-membrane* (MAM), cette dernière représentant un site majeur de signalisation de l'immunité innée (238-242).

La signalisation des RLRs dépend de la reconnaissance de leurs substrats et d'une succession de modifications post-traductionnelles. Dans le cas de RIG-I, le changement conformationnel initié par la liaison d'acides nucléiques viraux au niveau du CTD, puis au domaine DExD/H permet de lever le frein moléculaire répresseur et d'exposer ses domaines CARD. Toutefois, cet événement ne suffit pas en soi à l'activation de MAVS (243). En effet, d'autres modifications coordonnées incluant la déphosphorylation et l'ubiquitination séquentielle des CARDS de RIG-I et de MDA5 semblent impliquées à leur plein fonctionnement. En fait, il a été observé que la phosphorylation constitutive de certaines sérines et thréonines au niveau des CARDS de RIG-I (Ser8 et Thr170) et de MDA5 (Ser88) est rapidement perdue suivant une infection virale. Cette déphosphorylation surviendrait suivant la liaison initiale des RLRs aux ARN viraux; l'exposition de leurs CARDS s'ensuivant permettrait la liaison des *protein phosphatase 1* (PP1) $\alpha$  et PPI $\gamma$ . Cette déphosphorylation représenterait en fait une étape clé dans le recrutement de certaines E3 ubiquitines ligases aux RLRs qui catalyseraient leur ubiquitination (244-246).

Dans le cas de RIG-I, ce sont les E3 ligases TRIM25 et Riplet qui ont été identifiées en tant que responsables de telles modifications. TRIM25 est recruté aux CARDS suivant la reconnaissance d'acides nucléiques viraux par RIG-I pour ensuite y lier une chaîne de polyubiquines au niveau de la Lys172 (247). Quant à Riplet, en

se liant au CTD, cette dernière médierait la polyubiquitination en Lys63 du CTD et des CARDS (248). Récemment, il a été démontré que l'activation de RIG-I dépendent aussi de la présence de chaînes libres d'ubiquitines et de sa capacité à les lier (20403326). En effet, la liaison de RIG-I à de telles chaînes induirait sa tétramérisation et permettrait l'activation de MAVS *in vitro* (249, 250). L'identité de la ligase responsable de la formation de telles chaînes a été révélée grâce à une étude récente. Ce serait en fait Riplet qui, en partenariat avec différentes enzymes de conjugaison (Ube2D3 Ube2N), serait en mesure de catalyser à la fois l'ubiquitination covalente de RIG-I et la formation de chaînes libres d'ubiquitine ce qui mènerait globalement à l'activation de RIG-I, de MAVS et des voies de signalisation en aval (251).

D'autre part, les protéines impliquées dans l'ubiquitination de MDA5 et/ou la production de chaînes libres d'ubiquitines auxquelles se lient MDA5 demeurent quant à elles inconnues (249). Nonobstant, au même titre que RIG-I, ces modifications demeurent importantes pour son regroupement en structures oligomériques ayant la capacité d'activer MAVS (249). D'ailleurs, en reconnaissant certaines structures internes des ARNdb, il semble que MDA5 utilise les longs brins d'ARN en tant que plateforme signalétique sur laquelle, il s'oligomériser en filament hélicoïdal de manière à lier MAVS (252-254).

Ainsi, l'activation des RLRs survient suivant un enchaînement de différents changements conformationnels et de quelques modifications covalentes menant à leur recrutement à leur adaptateur commun en aval, MAVS.

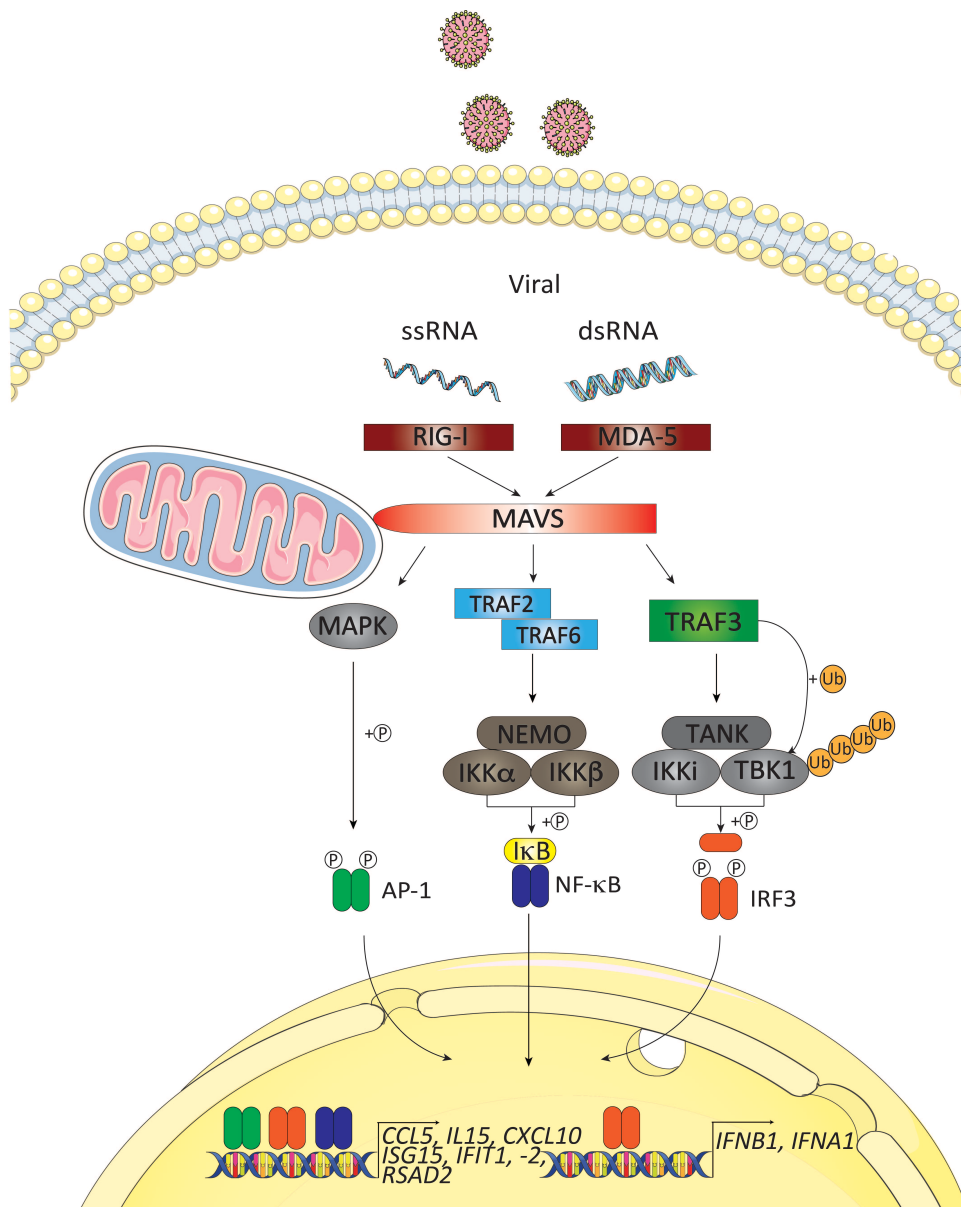
La protéine adaptatrice établissant le lien entre la détection des acides nucléiques viraux par les RLRs et l'activation de la signalisation en aval a été identifiée parallèlement par différents groupes comme étant MAVS (238, 241, 255, 256). Les domaines connus de MAVS incluent un domaine CARD au niveau de son extrémité N-terminale, une région riche en prolines et un domaine TM C-terminal. À travers sa séquence, MAVS présente aussi trois motifs d'interaction avec les protéines TRAF (TIM; *TRAF-interacting motifs*) dont deux se situent à même la région riche en prolines et l'autre aux abords du TM (256). Grâce à son domaine TM, MAVS s'ancre au niveau de différents ensembles riches en membranes incluant la mitochondrie, les peroxysomes et les MAM (241, 257, 258). Ainsi, par l'interaction

RLR-MAVS, ce dernier s'oligomérisé en une structure similaire aux prions de manière à former un complexe multiprotéique de signalisation, le signalosome de MAVS (259). Plus précisément, la liaison homotypique entre les CARDS des tétramères de RIG-I avec celui de MAVS initie la conversion de la forme monomérique auto-inhibitrice de MAVS en la formation d'un filament similaire aux prions dont le noyau est composé de CARDS polymérisés. Ces filaments de MAVS initiaux s'auto-propagent ensuite de manière spontanée menant à la formation d'une plateforme de signalisation (259-261).

L'initiation de la réponse antivirale en aval de MAVS dépend de plusieurs effecteurs cellulaires qui coordonnent l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, IRF3/7 et AP-1. À travers ses TIMs, MAVS est en mesure de recruter TRAF2 et TRAF6 qui favorisent l'activation des MAPK et des IKKs menant à l'activation respective d'AP-1 et de NF- $\kappa$ B, et ce, à travers différents processus moléculaires similaires à ceux de la voie des TLRs tels qu'expliqués à la section 1.2.2.1.1.1 (256, 262-264). De plus, MAVS a la capacité de lier TRAF3, une étape essentielle orchestrant l'activation d'IRF3. En effet, l'absence de TRAF3 résulte en une détérioration de l'induction des IFN de type I en réponse à une infection par un virus à ARN (201). TRAF3, tout comme les adaptateurs NEMO, *TRAF family member-associated NF-kappa-B activator* (TANK), *nucleosome assembly protein 1* (NAP1) et *similar to NAP1 TBK1 adaptor* (SINTBAD), sont liées de manière constitutive à TBK1. Suivant son recrutement à MAVS, TRAF3 subit une auto-ubiquitination en Lys63 ce qui renforce sa capacité à lier ces adaptateurs. Leur recrutement à TRAF3 consolide ainsi le rapprochement et l'activation des kinases TBK1 et IKK $\epsilon$  (265-268). La liaison de TRAF3 à MAVS s'effectue entre le domaine TRAF de TRAF3 et le TIM situé à l'extrémité C-terminale de MAVS (269-271). Néanmoins, une étude récente rapporte plutôt que TANK, NAP1 et SINTBAD ne serait pas impliqué et que seul NEMO aurait un rôle à jouer dans l'activation de TBK1 (272).

Certaines études ont par ailleurs identifié TRAF3 en tant que composante essentielle de la transautophosphorylation de TBK1 en Ser172, une étape essentielle préliminaire à la phosphorylation d'IRF3 en Ser396 et en Ser402 (242, 269).

Parallèlement, l'activation de IKK $\epsilon$  permet aussi la phosphorylation d'IRF3/7 permettant ainsi leur dimérisation et leur translocation nucléaire (98, 273). Globalement, ces événements mènent à la production des IFNs de type I et des gènes antiviraux (chapitre 1, figure 4).



**Figure 4 : La voie de signalisation des RLRs**

Suivant la liaison des acides nucléiques viraux aux RLRs cytosoliques, incluant RIG-I et MDA5, ces derniers s'associent avec leur adaptateur MAVS. Ceci initie les événements signalétiques menant à l'activation des facteurs de transcription latents AP-1, NF-κB et IRF3. En fait, alors que l'activation de la voie MAPK est nécessaire à l'activation d'AP-1, l'activation de NF-κB dépend plutôt de l'action concertée des kinases IKKα et IKKβ suivant leur activation par un complexe formé de TRAF2 et TRAF6. De son côté, la phosphorylation activatrice d'IRF3 est catalysée par TBK1 dont l'activation découle de son ubiquitination par TRAF3. Globalement, ces voies de signalisation coordonnent la production d'IFNs de type I, de cytokines proinflammatoires, de chimiokines, et de protéines antivirales. Le modèle a été créé en utilisant les gabarits de *Servier Medical Art* sous une licence non restrictive CCBY 3.0 (<https://smart.servier.com/>).

Par ailleurs, certains facteurs clés normalement impliqués dans la voie de signalisation des *tumor necrosis factor receptor 1* (TNFR1) participent aussi à l'activation de NF- $\kappa$ B au niveau de MAVS. En effet, le recrutement de la protéine *TNFR-associated death domain* (TRADD), un adaptateur important dans la signalisation du TNFR, auprès de MAVS permet la formation de différents complexes contribuant à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF3/7 (274). En effet, en interagissant avec la *Fas-associated death domain-containing protein* (FADD) et la kinase RIP1, TRADD permet l'activation des caspases 8 et 10 qui interagissent avec FADD grâce à la liaison de leurs CARDS respectifs (238). L'activité catalytique de ces caspases est importante dans la programmation de la mort cellulaire, mais aussi dans la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (275). D'autre part, TRADD favorise aussi le rapprochement entre TRAF3 à MAVS de manière à favoriser l'activation d'IRF3/7.

D'un autre côté, la découverte d'une protéine jouant un rôle essentiel dans la réponse antivirale a permis de proposer un rôle du réticulum endoplasmique (ER) dans la formation du complexe signalétique menant à l'activation d'IRF3. L'expression de cette protéine nommée *stimulator of IFN genes* (STING; aussi MITA, MPYS et ERIS) semble nécessaire à l'activation complète d'IRF3 et à la production d'IFN de type I (276-278). D'ailleurs, la diminution de son expression par ARNi ou par délétion génétique compromet la capacité des cellules hôtes à combattre une infection d'un virus à ARN. Toutefois, cet effet semble être dépendant du type cellulaire puisque, contrairement aux fibroblastes, l'absence de STING n'a aucun effet sur la réplication virale dans les macrophages et les cellules dendritiques. STING est une protéine qui se localise au niveau de la membrane du ER à l'état basal. Certaines études proposent aussi la présence de STING au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (278-280). Au niveau de la mitochondrie, STING pourrait interagir avec MAVS, TBK1 et IRF3 pour favoriser l'activation de cette dernière. D'un autre côté, sa présence au niveau du ER lui permettrait de s'associer avec le complexe TRAP, un module facilitant la translocation des protéines à travers le ER. Ces complexes protéiques situés au niveau du ER ont aussi le pouvoir de



recruter TBK1 afin de faciliter son activation et celle d'IRF3 et la production d'IFN- $\beta$  (277, 278). Il a ainsi été proposé que STING, de par sa liaison à RIG-I, pourrait être en mesure d'assister la reconnaissance des ARNs viraux se faisant traduire au niveau du ER (277). De manière intéressante, alors que les effets ci-haut ont été décrits suivant une infection par certains virus à ARN ou par stimulation au poly(I:C), STING a aussi été identifié comme étant une protéine adaptatrice permettant l'activation de TBK1 et d'IRF3 lors d'infections de certains virus à ADNdb, et ce, indépendamment de RIG-I ou MDA5 (281, 282).

### 1.2.2.3 Les senseurs cytoplasmiques d'ADN viral

La famille des récepteurs reconnaissant l'ADN viral au niveau du cytosol en est une hétéroclite dont plusieurs membres jouent des rôles importants. Le premier PRR impliqué dans la reconnaissance d'ADN à être identifié est TLR9; il demeure encore aujourd'hui le seul PRR endosomal à pouvoir reconnaître l'ADNdb (196). Préférentiellement exprimé au sein d'endosomes dans les pDCs, TLR9, comme décrit précédemment, lie des oligodéoxynucléotides contenant des motifs CpG non méthylés hautement prévalents dans l'ADN génomique bactérien et viral (283). D'un autre côté, il est maintenant bien reconnu que l'ADN du soi ou provenant d'un pathogène peut induire une réponse immunitaire innée en atteignant le cytoplasme plutôt que les endosomes. L'accumulation d'une telle quantité d'ADN au niveau cytoplasmique peut se produire par infection de la cellule par des pathogènes intracellulaires (c.-à-d. virus, bactéries, parasites) (284-287), par dysfonction des mécanismes de métabolisme endolysosomal d'ADNs exogènes (288) ou par une altération du système de dégradation des débris de réplication d'ADNs endogènes (289, 290). L'induction de cytokines et d'IFNs de type I a d'ailleurs été démontrée dans de nombreux types cellulaires, et ce, indépendamment de TLR9.

Le premier senseur cytosolique d'ADN à être identifié est le récepteur *DNA-dependent activator of IRFs* (DAI) (291). En se liant à l'ADN et en reconnaissant la forme synthétique d'ADN poly(déoxyadénylique-déoxythymidylique) (polydA:dT), DAI est en mesure de stimuler l'expression d'IFNs de type I en activant NF- $\kappa$ B et IRF3

(291). Toutefois, bien que DAI soit impliqué dans la reconnaissance d'ADNdb dans la lignée cellulaire de fibroblastes murins L929 et dans les fibroblastes humains (292, 293), aucun rôle de DAI n'a pu être observé ni dans les lignées cellulaires humaines monocytiques (THP1) et épithéliales (A549), ni *in vivo* (294, 295). Le second senseur d'ADN cytosolique à être caractérisé est l'ARN polymérase III. Son effet résulterait de sa capacité à transcrire les d'ADNdb riches en adénines et en thymidines (AT), tels que le poly(dA:dT), en ARN arborant une coiffe 5'-triphosphate pouvant être reconnu par RIG-I (296, 297). Cette découverte explique ainsi le rôle apparent de MAVS dans la réponse antivirale suivant une stimulation avec l'ADN synthétique poly(dA:dT) (298). Malgré la caractérisation de ces senseurs, le fait que DAI semble être impliqué seulement dans certaines lignées cellulaires et que l'ARN polymérase III ne peut expliquer l'induction d'IFNs de type I suivant une stimulation avec de l'ADN pauvre en AT admet l'existence de PRRs cytosoliques supplémentaires reconnaissant l'ADN. Depuis, de nombreux autres récepteurs cytosoliques ont d'ailleurs été décrits incluant *absent in melanoma 2* (AIM2) AIM2 et l'*IFN- $\gamma$ -inducible protein 16* (IFI16), *leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1* (LRRFIP1), DHX9, DHX36, DDX41, Ku70, *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* (DNA-PKcs), MRE11, *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) et Rad50 (299, 300). C'est en fait l'identification d'une nouvelle protéine adaptatrice nommée STING qui a entre autres stimulé la découverte de ces nombreux autres senseurs d'ADN de l'immunité innée (276, 278, 279, 301).

En plus des rôles de STING au niveau de la reconnaissance des virus à ARN, ce dernier représente l'adaptateur central de la reconnaissance de l'ADN. En effet, similairement à son homologue MAVS de la réponse à l'ARN, STING est d'une importance capitale dans l'induction d'IFN de types I en réponse aux virus à ADN. Des souris STING<sup>-/-</sup> présentent d'ailleurs une réponse restreinte à une infection aux virus à ADN (277). Les détails mécanistiques qui sous-tendent l'effet de STING s'apparentent à ceux de MAVS; STING pourrait mobiliser directement TRAF3 et/ou TBK1 afin de provoquer la phosphorylation activatrice d'IRF3 et la production subséquente d'IFNs de types I et d'ISGs (302, 303). De manière intéressante, outre son rôle en tant que protéine adaptatrice, STING semble impliqué dans la

reconnaissance de seconds messagers tels que les dinucléotides cycliques (CDN). Les CDNs représentent en fait des molécules produites par différents pathogènes et possèdent un pouvoir de signalisation lorsqu'ils sont détectés au niveau intracellulaire. STING a d'abord été caractérisé en tant que senseur du CDN bactérien nommé diguanylate monophosphate cyclique (c-di-GMP) (304), puis, plus récemment, en tant que senseur du second messager guanylate monophosphate adénosine monophosphate cyclique (*cyclic GMP-AMP*; cGAMP) (305). Bien que la présence de cGAMP ait été identifiée dans certaines bactéries tels que *Vibrio Cholerae* (306), ce serait plutôt la production de cGAMP par les cellules eukaryotiques qui serait responsable de la réponse médiée par STING (305). À travers le fractionnement biochimique d'extraits cellulaires et l'utilisation de spectrométrie de masse, Sun et coll. ont été en mesure d'identifier cGAS comme étant l'enzyme responsable de la reconnaissance de l'ADNdb cytosolique et de la synthèse de cGAMP (307).

cGAS catalyse donc la production de cGAMP en présence d'ADNdb au niveau cytosolique. En fait, en liant directement le squelette phosphate de l'ADNdb, cGAS se dimérise et le changement conformationnel s'ensuivant permet aux substrats nucléotidiques (GTP et ATP) d'atteindre le site actif favorisant ainsi la formation de cGAMP. Le rôle de cGAS dans la reconnaissance de l'ADN a pu être confirmé *in vivo* étant donné la disponibilité de modèle murin génétique cGAS<sup>-/-</sup>. Ces souris sont d'ailleurs plus susceptibles aux infections virales au HSV-1. De plus, les fibroblastes et les *bone marrow-derived macrophages* (BMDMs) isolés de telles souris étaient incapable d'induire les cytokines pro-inflammatoires et les IFNs de type I normalement observés suivant une infection par un virus à ADN (308, 309). D'autre part, similairement à IFI16, cGAS est impliqué dans la reconnaissance du VIH-1 et semble être la protéine responsable de la production de cGAMP et d'IFNs suivant une infection des cellules par ce virus (310). De manière intéressante, des études récentes démontrent que le senseur nucléaire d'ADN IFI16 coopère avec cGAS lors de la reconnaissance d'ADN. En effet, son absence limite la production de cGAMP par cGAS et diminue l'activation de STING (311, 312).

### 1.2.3 COMPARTIMENTALISATION DE L'IMMUNITÉ INNÉE

La famille des PRRs en est une dont les membres détiennent des rôles extrêmement variés et se retrouvent d'ailleurs au niveau de nombreux compartiments. En effet, on les retrouve au niveau extracellulaire (p. ex. les molécules du complément, les collectines, les pentraxines), au niveau des surfaces des membranes cytoplasmiques (p. ex. les TLR1, 2, 4, 5, 6, les CLR), et au niveau intracellulaire (p. ex. les NLRs, les RLRs et les TLR3, 7, 8 et 9). Alors que les PRRs sécrétés au niveau extracellulaire agissent directement sur les microbes afin de promouvoir la phagocytose ou la mort des micro-organismes détectés, seuls les PRRs présents à la surface ou à l'intérieur des cellules ont la capacité d'induire une signalisation menant à la production de cytokines inflammatoires et/ou antivirales. Comme présenté, ce sont les récepteurs intracellulaires, plus spécifiquement les TLRs vésiculaires et les RLRs cytosoliques qui détiennent la capacité de reconnaître les acides nucléiques viraux intracellulaires. En effet, contrairement à la grande majorité des micro-organismes, les virus doivent atteindre le cytosol afin d'accéder à la machinerie cellulaire pour se répliquer. Ainsi, la localisation sous-cellulaire des RLRs et des TLRs représente un mode de détection particulièrement bien adapté à la reconnaissance des micro-organismes pathogènes et virulents se caractérisant par leur capacité à s'introduire à l'intérieur de la cellule (313, 314).

En se trouvant dans le compartiment cytosolique, les RLRs sont bien positionnés pour détecter rapidement les motifs moléculaires pathogéniques. Par ailleurs, la localisation des TLRs vésiculaires, se retrouvant plus particulièrement dans les compartiments endosomaux tardifs, favorise aussi la détection rapide des virus qui dépendent de leur endocytose pour atteindre l'intérieur de la cellule. En effet, en étant acheminés vers l'environnement hydrolytique des endosomes tardifs, les virus libèrent leurs acides nucléiques qui pourront être reconnus par les TLRs endosomaux. De surcroît, la compartimentalisation de la reconnaissance des antigènes viraux favorise la discrimination du soi et du non-soi. Les TLRs endosomaux (TLR3, 7, 8, 9) nécessitent toutefois l'action d'un chaperon protéique afin d'atteindre ce lieu de détection. En effet, UNC-93B, une protéine à 12 passages

TM résidant dans le ER, est un partenaire commun essentiel à la signalisation initiée par ces récepteurs (315, 316). D'ailleurs, chez les souris, une mutation faux sens dans le gène codant pour UNC-93B empêche le transport de ces récepteurs de leur site de production au niveau du ER au lieu de la reconnaissance des pathogènes d'où ils signalent, les endolysosomes (317). Leur présence au niveau de ce compartiment est particulièrement importante puisque cela leur permet de subir leur protéolyse activatrice de manière à initier leur signalisation (318). De manière intéressante, bien que de nombreux PRRs détectent des déterminants structuraux et moléculaires qui sont absents des cellules hôtes (p. ex. de longs segments d'ARNdb et de l'ARNsb non coiffés), certains autres (p. ex. TLR7/8 et TLR9) reconnaissent des structures qui sont présente à la fois dans les virus et dans la cellule hôte. Pour les TLRs 7, 8 et 9, c'est en fait la compartimentalisation de ces TLRs dans les endosomes qui permet de prévenir la reconnaissance des molécules du soi (319). Ainsi, outre les déterminants structuraux et moléculaires permettant aux récepteurs de l'immunité innée de reconnaître spécifiquement certains motifs exogènes provenant de bactérie ou virus, les cellules présentent aussi d'autres composantes structurelles leur permettant de différencier le soi du non-soi et d'éviter l'activation aberrante de voies de signalisation.

D'autre part, alors que la schématisation classique des processus signalétiques admet d'emblée que la localisation sous-cellulaire des PRRs indique le lieu d'où la transduction du signal de l'immunité innée est amorcée, une multitude de données suggèrent plutôt que le site d'interaction PRR-ligand ne constitue pas nécessairement leur site de signalisation. En fait, de nombreux PRRs doivent plutôt être transporté vers une localisation alternative afin d'interagir avec leur adaptateur respectif, démontrant ainsi une séparation spatiale entre les sites de détection et ceux de signalisation (320). Au niveau des PRRs reconnaissant les acides nucléiques viraux, un tel exemple est fourni par le senseur d'ADN ayant des motifs CpG, le TLR9. Dans les pDCs, la réponse transcriptionnelle découlant de l'activation du TLR9 mène à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFNs. Néanmoins, alors que l'induction des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-12 provient des TLR9 se trouvant dans les endosomes tardifs, la production des IFNs nécessite son transport

vers les *lysosomes-related organelles* (LRO) (321). Le transport de TLR9 vers les LROs est en fait réalisé par l'*adaptor protein-3* (AP-3); l'absence de cette dernière prévient la redistribution de TLR9 au LROs, et, par conséquent, prévient la production d'IFNs. Similairement, la signalisation découlant de la reconnaissance des virus à ADN par le récepteur nucléaire IFI16 nécessite la translocation de ce dernier du noyau vers le compartiment cytosolique (322, 323). En effet, l'acétylation de ce dernier par le coactivateur transcriptionnel p300 permet à IFI16 de se relocaliser au niveau du cytoplasme (323). Toutefois, la présence d'une protéine accessoire coordonnant un tel mouvement demeure inconnue.

Le déplacement des récepteurs vers un compartiment sous-cellulaire de signalisation est un processus qui correspond aussi au mode d'action des RLRs. En effet, les RLRs, composés de RIG-I et de MDA-5, sondent le compartiment cytosolique afin de détecter la présence d'ARN viral avant de se relocaliser au niveau de leur adaptateur membranaire, MAVS. Plus précisément, RIG-I, suivant sa liaison à l'ARN, forme un complexe de translocation avec la ligase TRIM25, qui catalyse son ubiquitination, et avec le chaperon moléculaire 14-3-3 $\epsilon$  (247, 324). L'importance de cette dernière se reflète par le fait que son absence prévient le transport de RIG-I aux fractions membranaires du MAM, de la mitochondrie ou du peroxysome contenant MAVS (324). Ainsi, à l'instar des TLRs, le site sous-cellulaire de signalisation des RLRs semble être dissocié de celui de la reconnaissance de leurs ligands. Le mouvement entre ces deux emplacements en est un régulé par des chaperons qui favorisent le positionnement des récepteurs au niveau de structures organellaires sous-jacentes afin de permettre l'assemblage d'un réseau de complexes fonctionnels. Cette signalisation organellaire est en fait particulièrement importante dans la signalisation initiée par les RLRs.

### 1.2.3.1 La signalisation organellaire des RLRs

La compartimentalisation des processus biochimiques et des réponses signalétiques est un important mode de régulation influençant de nombreuses fonctions cellulaires fondamentales. Au niveau de la reconnaissance des virus, l'activation des voies de signalisation dépend en fait de la présence constitutive de senseurs et d'adaptateurs au niveau des compartiments sous-cellulaires où se trouvent les virus, et de leur capacité à se mobiliser et à interagir avec les protéines effectrices en aval. Comme mentionné, les TLRs reconnaissant les acides nucléiques viraux font intervenir les adaptateurs TRIF et MyD88 au niveau des endosomes et des LRO afin d'initier leur signalisation (319, 325). D'autre part, les récepteurs intracellulaires (c.-à-d. cytosoliques ou nucléaires) de l'ADN viral font plutôt intervenir l'adaptateur STING situé au niveau du ER. Les RLRs, quant à eux, dépendent de l'adaptateur MAVS qui se trouve au niveau des mitochondries, des peroxysomes et des MAM (241, 257, 258).

La localisation de MAVS au niveau de chacun de ces compartiments est importante pour sa signalisation. Initialement identifiée en tant que protéine de la membrane externe de la mitochondrie, sa présence au niveau des MAMs et des peroxysomes semble jouer un rôle majeur dans la transduction du signal. En tant que sous-domaine cellulaire se trouvant à l'interface entre le ER et la mitochondrie, les MAM représentent un site de contact dynamique auquel les peroxysomes et les mitochondries s'arriment afin de créer une plateforme de signalisation pour la réponse antivirale (257, 258, 326). En fait, alors que les rôles précis découlant de la diversité de localisation sous-cellulaire de MAVS ne sont pas complètement élucidés, il a été proposé que MAVS entraîne différentes réponses en fonction de sa localisation. En effet, suivant une infection virale, la présence de MAVS au niveau des MAM et de la mitochondrie permettrait l'expression d'IFNs de type I et d'ISGs, alors que sa présence au niveau des peroxysomes favoriserait une production rapide d'ISGs de manière indépendante des IFNs de type I, mais dépendante des IFNs de type III (327). En effet, la réponse provenant de l'activation de MAVS mène à la production d'IFNs de type I et de type III en réponse à différentes infections virales,

incluant le virus de l'hépatite C. Toutefois, la présence du complexe de protéases NS3-NS4A de l'HCV inactive la signalisation de MAVS en clivant ce dernier au niveau de la cystéine 508 présente à la base de son domaine TM provoquant ainsi la libération de MAVS de sa fraction membranaire (328). De manière intéressante, le complexe NS3-NS4A cible MAVS plus particulièrement au niveau des MAMs démontrant l'importance de cette interface organellaire (258). D'autre part, la présence d'une fraction de ces protéases au niveau des peroxysomes suggère aussi une régulation potentielle de la signalisation de MAVS à partir de cette organelle (258). D'ailleurs, la relocalisation de MAVS vers le compartiment cytosolique suivant son clivage contrecarre la capacité des cellules à répondre à l'activation des RLRs et bloque la production d'IFN de type I et de type III (257, 258, 327). En réponse à une infection virale, il a été démontré que RIG-I, conjointement avec TRIM25, est recruté dans une fraction intracellulaire membranaire afin de lier MAVS. Il a en fait été montré que MAVS interagit avec RIG-I et son effecteur signalétique en aval, TRAF3, au niveau des MAM (258). Ceci démontre l'importance de ce microdomaine compartimental dans l'immunité innée. En étant situé aux limites du ER et de la mitochondrie, le MAM semble ainsi fournir un lieu d'échange dynamique entre la mitochondrie et les peroxysomes favorisant par le fait même l'organisation et le recrutement des joueurs de l'immunité innée antivirale.

Globalement, les détails moléculaires et les modifications post-traductionnelles entourant l'activation des PRRs et à leur recrutement au niveau de leur adaptateur respectif a bénéficié d'une attention particulière ayant permis de mieux décrire le mode de fonctionnement et l'importance de la signalisation organellaire. Toutefois, la manière par laquelle les protéines en aval de l'activation de ces adaptateurs, tels que TRAF3, sont recrutées aux compartiments cellulaires signalétiques demeure grandement inconnue. L'implication centrale de TRAF3 dans la production d'IFNs de type I en réponse à différents stimuli en fait un candidat de recherche intéressant.



### 1.2.3.2 TRAF3 convergence des signaux menant à la production d'IFNs de type I

Les protéines TRAFs font partie d'une famille d'adaptateurs qui permet d'établir l'interconnexion entre la reconnaissance de nombreux ligands par leur récepteur, tels que TNFR, IL1R, TLR, RLR, cGAS, et les effecteurs en aval impliqués dans les voies de signalisation inflammatoire et immunitaire. Composée de sept membres, de TRAF1 à TRAF7, cette famille présente certaines caractéristiques structurales communes. Au niveau de l'extrémité C-terminale, ils possèdent tous un domaine TRAF qui contient un motif superhélice (CC; *coiled-coil*) responsable de leur oligomérisation et de leur interaction avec les récepteurs et les protéines effectrices impliqués dans les voies de signalisation qu'ils régulent. Par ailleurs, à l'exception de TRAF1, tous les TRAFs comportent en leur région N-terminale un domaine *Really Interesting New Gene* (RING) *finger* qui a la capacité de lier les enzymes d'ubiquitination et leurs substrats afin de catalyser leur activité en tant qu'ubiquitine ligase E3 (329).

Au niveau de la réponse antivirale, TRAF3 s'est avéré être un des facteurs critiques permettant l'activation d'IRF3 et la production d'IFNs de type I s'ensuivant (185, 201, 269). En fait, les événements menant à l'activation de TRAF3 demeurent un prérequis à la transautophosphorylation activatrice de TBK1 sur sa Ser172, la kinase responsable de la phosphorylation et de l'activation d'IRF3 (330-333). Ce faisant, TRAF3 joue un rôle dans de nombreuses voies de signalisation menant à l'activation d'IRF3 et à la production d'IFNs de type I. L'importance de cette protéine réside dans le fait qu'elle agit en tant que lien critique joignant les protéines adaptatrices de nombreux PRRs aux kinases régulatrices en aval. En effet, TRAF3 représente un lieu de convergence de nombreuses voies de signalisation (334). Suivant la production de cGAMP médiée par la reconnaissance d'ADN génomique viral par cGAS, cette dernière initie une réponse antivirale innée dépendante de STING. STING, en liant cGAMP, se dimérise et recrute TRAF3 et TBK1 entraînant ainsi une réponse puissante aux IFNs (278). Similairement, lors de l'activation des TLRs endosomaux, les protéines adaptatrices MyD88 et TRIF sont recrutés à leurs

TLRs respectifs afin d'initier leur signalisation grâce à l'activation de TRAF3. De plus, à l'instar de son implication dans la mobilisation des voies de signalisation des senseurs d'ADN et des TLRs, TRAF3 semble être une protéine effectrice essentielle dans la production d'IFNs de type I en réponse à l'activation des RLRs cytosoliques (185, 201, 278). Il a d'ailleurs été démontré que, suivant une infection virale à ARN, l'absence de TRAF3 dans les cellules MEFs TRAF3<sup>-/-</sup> réduit significativement leur capacité à produire des IFNs de type I et les rend plus susceptibles aux infections (201, 271). Similairement à la signalisation médiée par STING, MyD88 et TRIF, l'activation des RLRs mène au recrutement de TRAF3 à la protéine adaptatrice MAVS à partir de laquelle TRAF3 active TBK1-IKK $\epsilon$  et, subséquent, IRF-3 (269, 270). Ainsi, TRAF3 représente une protéine effectrice de la réponse antivirale qui doit se déplacer aux compartiments de signalisation où se situent les protéines adaptatrices à partir desquelles TRAF3 catalyse l'activation d'IRF3 et, conséquemment, la production d'IFNs de type I et de certains ISGs.

Comme décrit ci-haut, TRAF3 doit être recruté à ses adaptateurs en amont afin d'initier son activité. Toutefois, les déterminants moléculaires sous-jacents permettant un tel recrutement demeurent grandement inconnus.

Récemment, l'identification de STING en tant que protéine dont l'activité dépend de sa transition du ER au Golgi a permis de suggérer un mécanisme de recrutement de ses effecteurs en aval. En fait, résidant de manière constitutive au niveau du ER, STING utilise les voies sécrétoires endogènes afin d'initier son mouvement du ER au Golgi pour finalement aboutir dans des structures cytoplasmiques punctiformes pour sa dégradation (277, 335, 336). Lors de son processus de transport, STING pourrait donc recruter ses effecteurs en aval, TRAF3, TBK1 et IRF3, afin de stimuler l'induction des IFNs de type I (303, 337, 338). Ceci suggère ainsi un rôle du système de transport des protéines dans l'immunité innée antivirale. La nature et le rôle précis de ces différentes étapes de recrutement demeurent toutefois imprécis. D'un autre côté, en prenant avantage du rôle de deux protéines effectrices du système de sécrétion de type 3 (T3SS) des bactéries de genre *Shigella*, IpaJ et VirA, qui ciblent différentes étapes de la voie sécrétoire de l'hôte, il a été possible d'identifier la signalisation et le trafic de STING à des stades

intermédiaires de translocation au cours d'une infection/stimulation avec de l'ADN (337, 339). Ainsi il a été observé que le blocage de la translocation de STING du ER à l'*ER-to-Golgi intermediate compartments* (ERGIC), un réseau membranaire tubulovésiculaire situé près des *ER exit sites* (ERES), par une stimulation avec la protéine IpaJ et la brefeldin A, contrecarre directement l'activation de STING. D'autre part, la stimulation des cellules par la protéine VirA, ou par le nocodazole, un agent de dépolymérisation des microtubules, qui bloquent tous deux le transport entre l'ERGIC et le Golgi, n'a pas interféré avec la signalisation de STING, ainsi maintenu au niveau de l'ERGIC (337). Aussi, certains mutants de STING sont constitutivement actifs et se transportent spontanément à l'ERGIC d'où ils déclenchent une réponse antivirale de type I de manière continue. Ceci suggère que l'interaction avec TBK1 et IRF3 se déroule majoritairement au niveau de l'ERGIC et que le système de trafic protéique est d'une importance centrale dans l'organisation de l'immunité antivirale (337, 338).

Alors que le système de trafic protéique endogène semble être impliqué dans l'organisation de la réponse antivirale au niveau de l'adaptateur STING suivant une infection d'un virus à ADN, les structures cellulaires permettant le recrutement de TRAF3 à ses adaptateurs en amont suivant une infection virale restent grandement inconnues. Ainsi, étant donné l'importance de TRAF3 dans la signalisation et le fait que cette dernière semble essentielle à la réponse antivirale, particulièrement suivant l'activation des RLRs, notre groupe de recherche s'est efforcé à identifier de nouveaux partenaires de TRAF3 pouvant être impliqué dans la réponse antivirale innée et dont les rôles antérieurs pourraient proposer un nouveau modèle d'organisation de l'immunité au niveau des protéines effectrices en aval de la reconnaissance virale. Pour ce faire, notre laboratoire a utilisé une approche protéomique faisant intervenir une purification par affinité couplée à une analyse par spectrométrie de masse (AP/MS). Ceci a mené à l'identification d'un nouvel interactome faisant intervenir 12 partenaires potentiels de TRAF3, incluant TBK1 (340).

En utilisation cette approche, il a été possible d'identifier et de caractériser le rôle de deux nouveaux partenaires de TRAF3 dans l'immunité innée antivirale,

Sec16A et p115. Ces deux protéines possèdent des effets bien établis au niveau du système de transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique (ER) et l'appareil de Golgi. En effet, en tant que protéines influençant l'assemblage et le transport des vésicules comportant un manteau de complexes de coatomères (*coat protein complex II*; COPII), Sec16A et p115 détiennent un rôle important dans le trafic antérograde de protéines à l'interface entre le ER et l'appareil de Golgi. Sec16A s'assemble en fait au niveau des membranes du ER et forme une plateforme structurée définissant les sites de sorties du ER, l'ERES, d'où les vésicules COPII se mobilisent (341-343). De son côté, p115 est un adaptateur de liaison important permettant l'ancrage des vésicules au niveau du ER, de l'ERGIC, et du *cis*-Golgi (344-347). Suivant la confirmation de leur association et de leur co-localisation avec TRAF3, des essais faisant intervenir leur surexpression ou leur répression génétique ont permis de démontrer leur rôle positif dans l'induction de gènes antiviraux. Cette caractérisation du rôle insoupçonné de Sec16A et de p115 dans l'établissement d'un état antiviral propose ainsi un nouveau rôle du système de transport vésiculaire dans l'immunité innée antivirale (340). De cet interactome initial, l'identification de la protéine *TRK-Fused Gene* (TFG) en tant que partenaire de TRAF3 de haute prévalence représente ainsi une nouvelle avenue prometteuse vers la caractérisation et la compréhension plus détaillées du fonctionnement et du rôle de TRAF3 dans l'immunité innée antivirale.

#### **1.2.4 TRK-FUSED GENE (TFG) : UN SURVOL**

Le gène *Tropomyosin-receptor kinase (TRK)-fused gene (TFG)* encode pour une protéine conservée qui possède différentes fonctions encore mal définies. L'ADN complémentaire (ADNc) humain de TFG détient 1677 paires de base et encode pour une protéine de 400 acides aminés dont les nombreux motifs suggèrent des interactions avec de nombreuses protéines (348). Les caractéristiques structurales majeures de TFG se situent au niveau de son domaine N-terminal où se trouve une superhélice (CC) qui est impliquée dans son oligomérisation, de même qu'un domaine Phox/Bem 1P (PB1) dont la séquence comporte un site consensus de

liaison aux motifs SH2 étant donné la présence en position 33 d'une tyrosine phosphorylée. La partie C-terminale comporte quant à elle une séquence riche en prolines (PPGEPGP) représentant un site de liaison aux domaines SH3 (349-353).

TFG a d'abord été caractérisé en tant que protéine de fusion du NTRK1 formant l'oncogène thyroïdien TRK-T3 (354). Par ailleurs, TFG semble aussi impliqué dans les réarrangements oncogéniques avec l'*anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase* (ALK) menant aux lymphomes anaplastiques et avec le *neuron-derived orphan receptor 1* (NOR1) causant le chondrosarcome myxoïde extrasquelettique (355-357). En fait, résultant d'une aberration génomique structurale, les oncogènes de fusion représentent un des mécanismes d'oncogenèse les plus communs. Les translocations chromosomiques représentent d'ailleurs une cause fréquente de cancers tels que les leucémies, les lymphomes, les sarcomes et certains carcinomes. Ces translocations établissent un lien entre deux chromosomes distincts résultant souvent en la création d'une protéine chimère fusionnant deux segments de gènes différents. Dans la grande majorité des cas, ces gènes de fusion partagent certaines caractéristiques incluant une expression et une activité constitutive, et une capacité à s'oligomériser. Ce faisant, ce type de protéine mène souvent à la transformation oncogénique des cellules. Les récepteurs tyrosines kinases représentent des partenaires de translocation particulièrement prône à l'oncogenèse. Dans le cas de TFG, ces gènes de fusion font souvent intervenir la terminaison N-terminale de TFG et la partie C-terminale de la kinase associée (348, 358). La haute prévalence de TFG dans les tissus et la présence du domaine CC de TFG favorise l'expression et l'oligomérisation de la protéine de fusion menant ainsi à son autophosphorylation constitutive et à son activation oncogénique (358). Outre son implication en tant que partenaire de translocations chromosomiques dont les protéines chimériques résultantes ont été impliquées dans différents types de cancer, TFG joue un rôle prépondérant dans le trafic intracellulaire de protéines.

Le trafic intracellulaire des protéines est en fait un processus biologique essentiel permettant aux cargaisons protéiques biosynthétiques provenant du ER d'atteindre l'appareil de Golgi, les autres organelles et/ou l'espace extracellulaire de manière à favoriser la distribution normale des protéines à l'intérieur des cellules. Ce

transport antérograde est médié grâce à l'assemblage de cargos vésiculaires dont l'assemblage découle de l'action de la machinerie des COPII (359, 360). Les COPII s'organisent au niveau de sites spécifiques de la membrane du ER définies en tant que *transitional ER* (tER). En plus d'entraîner la concentration de protéines de sécrétion au tER, les protéines COPII favorisent aussi la déformation des membranes du ER et le bourgeonnement subséquent des vésicules/tubules entouré de COPII. Le manteau de COPII consiste en la juxtaposition de deux couches distinctes de protéines conférant aux vésicules un grand degré de flexibilité afin d'encapsuler de larges cargaisons de formes variées (361). L'assemblage de ce manteau COPII au niveau de la membrane du ER s'effectue d'abord par le recrutement de la petite GTPase Sar1. C'est en fait suivant sa fixation au GTP facilitée par son facteur d'échange des nucléotides guanyliques (GEF), Sec12, que Sar1 s'intègre à la membrane du ER (362). Ensuite, Sar1 recrute des hétérodimères de Sec23 et Sec24 afin de former la membrane interne de l'enveloppe des vésicules (363, 364). Alors que Sec24 recrute les protéines de cargaison à l'intérieur des complexes bourgeonnants, Sec23 assemble les hétérotétramères composés des protéines Sec13 et Sec31 de manière à former la couche externe (365-367). Le recrutement de Sec13 et de Sec31 permet en fait de faciliter le recourbement de la membrane en vue du détachement imminent de la vésicule des membranes du ER (368). L'étape ultime de la scission des vésicules COPII est orchestrée par la protéine activatrice de GTPase (GAP), Sec23, qui catalyse l'hydrolyse du GTP de Sar1, et ce, en synergie avec l'action de Sec31 (363, 367, 369). Ces vésicules peuvent ensuite fusionner avec l'ERGIC se trouvant aux abords des sites de bourgeonnement du ER. Cette interface comprenant les structures du tER, les vésicules COPII et l'espace menant à l'ERGIC forme l'ERES, un site d'échanges rapides de vésicules COPII. La protéine Sec16, un facteur accessoire important dans la modulation de la formation des vésicules, joue un rôle important dans le maintien de cette structure (341, 370). Sec16, en interagissant avec les protéines COPII, possède aussi la capacité de favoriser la liaison du GTP à Sar1 par Sec12, et ce, tout en inhibant l'activité GAP de Sec23 (371, 372). En stabilisant ainsi l'activité catalytique des protéines COPII, Sec16 permettrait de prévenir la scission prématurée des vésicules du ER (373). Le rôle de

TFG dans le trafic des protéines découle en fait de sa caractérisation initiale en tant que partenaire de Sec16 dans la modulation du bourgeonnement des vésicules COPII du ER (374). Sa présence au niveau de l'ERES, à l'interface entre l'ER et l'appareil de Golgi, favorise le transport de protéines par les vésicules COPII; la réduction de son expression diminue le niveau de sécrétion du ER. Plus précisément, TFG est en mesure de coordonner l'organisation spatiale de la biogenèse de vésicules COPII en agissant en tant que réseau polymérique au niveau de l'ERES. Ainsi, en concentrant physiquement les vésicules COPII dans l'espace entre l'ER et l'ERGIC, TFG forme un nouveau site de contact organellaire important pour le couplage efficace du bourgeonnement des vésicules COPII à leur fusion au niveau de l'ERGIC (375). Par ailleurs, le flux de membranes médié par TFG est important pour le maintien d'une organisation adéquate des organelles à l'intérieur des cellules. En effet, la diminution de l'expression de TFG altère la morphologie du ER, et désorganise les réseaux tubulaires de l'ERGIC et de l'appareil de Golgi. De plus, dans ces cellules, les mitochondries se retrouvent davantage en grappe plutôt que dans un motif plus dispersé à travers le cytoplasme (375, 376). De manière intéressante, certaines mutations dans le gène de TFG ont été reliées à différentes maladies incluant certaines formes de neuropathies héréditaires motrices et sensibles et la paraplégie héréditaire spasmodique. Ces effets semblent en fait être relié aux changements structuraux du ER secondaire aux dysfonctions du système de sécrétion des protéines (376-379).

D'un autre côté, notre laboratoire de recherche a démontré que le système de transport vésiculaire du ER au Golgi mène à la formation d'une plateforme membranaire permettant au positionnement de TRAF3 et MAVS au sein du réseau mitochondrial suivant une infection virale, un processus impliquant Sec16 (340). Au demeurant, le rôle précis de TFG au niveau de l'organisation d'une réponse antivirale innée efficace reste à confirmer. Toutefois, étant donné le rôle caractérisé de TFG dans la formation d'une telle plateforme membranaire au niveau de l'ERES, de sa colocalisation avec Sec16 et de son identification en tant que partenaire potentiel de TRAF3 renforcent les probabilités de son implication dans l'immunité innée. Par ailleurs, la caractérisation antérieure de la capacité de TFG à lier de nombreux

effecteurs des voies de signalisation de l'immunité innée antivirale incluant TANK, NEMO, SHP-1, c-Src, TRIM25, PIN1, PTEN et IFI16 favorise un rôle potentiel de TFG dans la réponse antivirale (350, 352, 380-384).



## CHAPITRE 2 – OBJET DU MÉMOIRE

### 2.1 CONTEXTE SOMMAIRE

L'initiation d'une réponse cellulaire antivirale innée contre les pathogènes représente une étape clé dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et dans la survie de l'hôte. Une compréhension plus détaillée des déterminants moléculaires gouvernant l'organisation optimale de cette réponse immunitaire antivirale demeure essentielle afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement d'infections virales et de maladies auto-immunes.

Généralement, l'instauration d'une puissante réponse antivirale repose sur la détection d'acides nucléiques viraux par des *pattern-recognition receptors* (PRR), des récepteurs philogénétiquement conservés (385, 386). L'identification des composantes virales par les PRRs déclenche de multiples voies de signalisation culminant en l'activation de nombreux facteurs de transcription latents, incluant l'IRF3, de même que NF- $\kappa$ B (43). Ces facteurs de transcription permettent directement l'expression de plusieurs gènes immunomodulateurs, incluant les interférons de type I (IFNs- $\alpha$  et IFNs- $\beta$ ) et les ISGs, qui perturbent la réplication et la dissémination des virus, et ce, tout en permettant la mobilisation de l'immunité adaptative (387). Seul un sous-groupe de PRRs peut mener à la synthèse d'IFNs de type I et à la production subséquente d'ISGs en réponse aux acides nucléiques viraux. Ces récepteurs incluent entre autres les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 localisés au niveau des endosomes, cGAS, de même que les RLRs, RIG-I et MDA5 (307, 388-390). Toutefois, malgré que ces TLRs soient impliqués dans la détection d'acides nucléiques viraux extracellulaires par certaines cellules clés du système immunitaire, la plupart des autres types de cellules, telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes, compte plutôt sur les RLRs cytosoliques pour détecter la réplication d'intermédiaires d'ARN viraux (216, 218, 220).

RIG-I et MDA5 sont des protéines similaires appartenant à la famille des hélicases DExD/H *box* et représentent les plus importants senseurs cytoplasmiques d'ARN viraux. Spécifiquement, RIG-I est un récepteur permettant la

détection de courts segments d'ARNdb de même que l'ARNsb contenant une coiffe 5'-PPP provenant de nombreux virus incluant le SeV, le HCV, le VSV et le virus de l'influenza (391). D'autre part, alors que MDA5 partage plusieurs de ses ligands avec RIG-I, tels que le composé synthétique poly(I:C), MDA5 détecte aussi les longues molécules d'ARNsb de différentes familles de virus telles que *Picornaviridae*, *Calciviridae*, *Coronaviridae* (217, 392). De par leur liaison aux ARNs viraux, RIG-I et MDA5 sont recrutés à la protéine adaptatrice nommée MAVS et s'y lient grâce à une interaction homotypique entre leurs domaines CARDS (241). L'interaction entre RIG-I et MAVS mène au recrutement de divers effecteurs, créant ainsi, un complexe macromoléculaire signalétique culminant ultimement à l'activation d'IRF3 (238, 241, 255, 256, 393). En fait, cette activation d'IRF3 dépend du recrutement initial d'un complexe de protéines composé minimalement de TRAF3, NEMO et TANK, qui contrôlent l'activité de TBK1 (242, 269). En effet, certaines études de délétion génétique ont permis l'identification de TRAF3 en tant que composante essentielle permettant la transautophosphorylation activatrice de TBK1 sur la Ser172 qui, à son tour, phosphoryle IRF3 sur la Ser396 et la Ser402 (201, 394). En somme, bien qu'une compréhension plus profonde des différents effecteurs impliqués dans la voie de signalisation des RLRs ait été atteinte au courant des dernières années, la manière par laquelle ces effecteurs sont recrutés l'un à l'autre afin d'initier une signalisation rapide et efficace demeure à être caractérisée. Cette meilleure compréhension de la manière par laquelle ces réseaux antiviraux sont incorporés dans les structures intracellulaires stimulera sans nul doute de nouveaux paradigmes dans le domaine de l'immunité innée.

À cet effet, de nombreuses études supportent maintenant le rôle de synapses sous-cellulaires, qui consiste en des sites de contact physique entre les organelles, dans l'établissement d'un échafaudage protéique duquel se transmet la signalisation immunitaire antivirale. La première preuve démontrant que la signalisation dépendante des RLRs cytosoliques puisse se propager à partir de telles structures provient d'études concernant MAVS, un adaptateur transmembranaire ayant différentes localisations intracellulaires incluant les mitochondries, les peroxysomes et les MAMs, une interface entre la mitochondrie et le ER (257, 258, 395). En fait, en

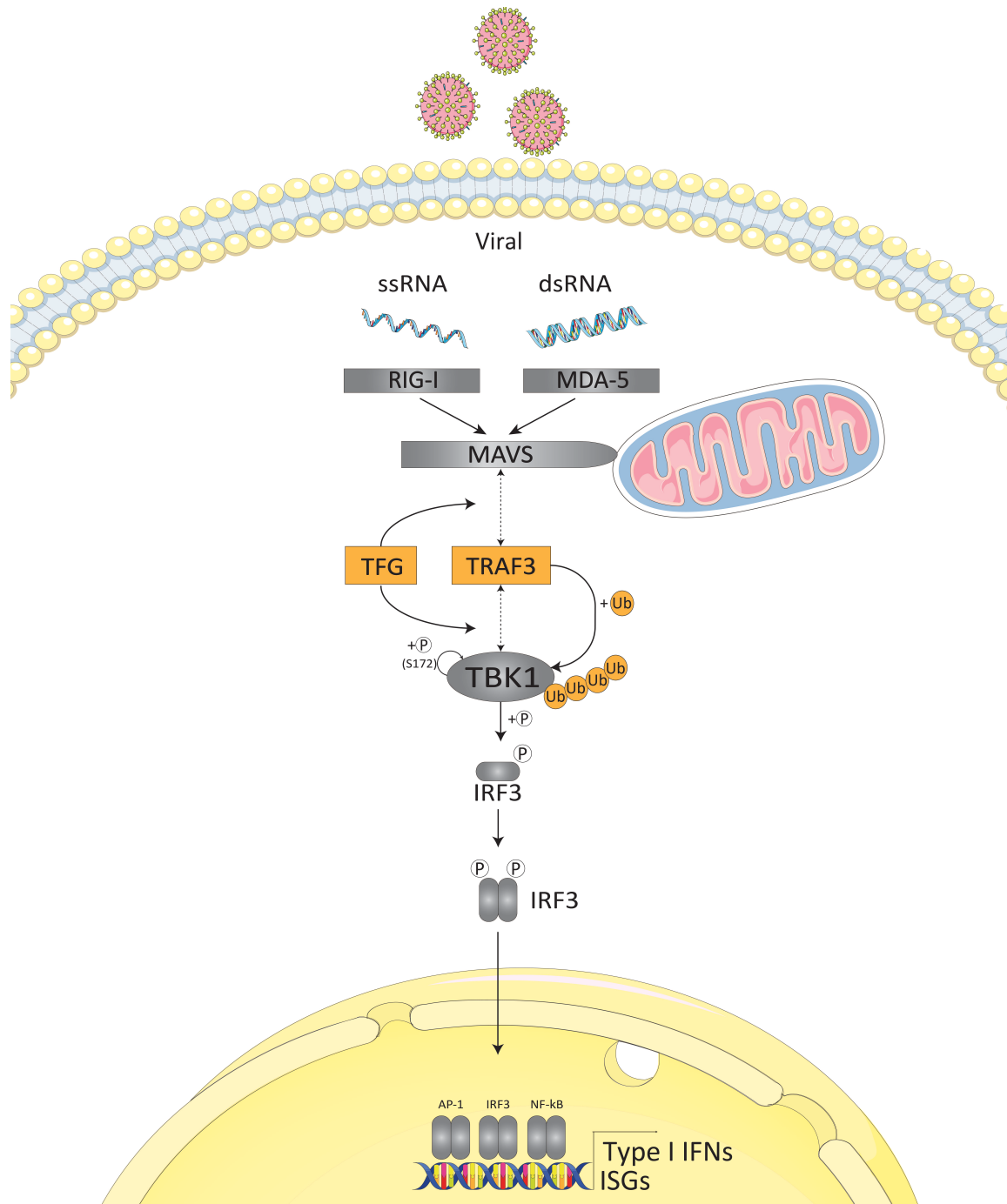
fonction de sa localisation sous-cellulaire, il a été proposé que MAVS pouvait soutenir différentes voies de signalisation (395). D'autre part, la découverte de nouveaux médiateurs qui interagissent avec MAVS, tels que STING, suggère un rôle du ER et du système de transport protéique dans l'immunité innée. En effet, il a été démontré que STING se transloque du ER vers l'appareil de Golgi de manière à s'associer avec TBK1 auprès de points cytoplasmiques précis (278, 301, 335). Conformément à ces observations, nous avons précédemment démontré que TRAF3 est contigu à de nombreuses composantes se trouvant entre le ER et l'appareil de Golgi (340). Néanmoins, la manière par laquelle les cellules permettent le transport d'effecteurs tels que TRAF3 vers ces synapses sous-cellulaires antivirales demeure largement irrésolue.

Identifié en tant que partenaire de haute probabilité de TRAF3 par le profilage protéomique de ce dernier, TFG présente de nombreuses caractéristiques laissant présager son rôle dans les voies de signalisation liées à la réponse antivirale. Ainsi, la caractérisation de TFG pourrait permettre de mieux comprendre les déterminants cellulaires structurants qui favorisent le recrutement de TRAF3 au niveau de certains compartiments sous-cellulaires d'où il forme le macrocomplexe MAVS-TRAF3-TBK1 afin d'induire une réponse antivirale dépendant d'IRF3.

## 2.2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

La réponse antivirale et la production concomitante d'interférons de type I représente des événements signalétiques clés dans la constitution d'un état antiviral puissant. Ainsi, l'élucidation des rôles de nouveaux régulateurs de l'immunité innée pourrait transformer le paradigme des traitements antiviraux en introduisant des options thérapeutiques visant à renforcer la réponse antivirale innée de l'hôte. Toutefois, l'activation aberrante de telles voies de signalisation pourrait mener à des conséquences délétères, incluant le développement de maladies autoimmunes. Une compréhension fine de la régulation des IFNs de type I demeure ainsi primordiale. Afin de prévenir une réponse incontrôlée, la transmission des signaux se produit dans des compartiments cellulaires distincts différenciant ainsi les sites impliqués dans la reconnaissance des PAMPs et ceux permettant la signalisation subséquente. Une telle distinction pourrait aussi être entrevue pour les effecteurs en aval qui doivent être recrutés à leurs adaptateurs afin d'engager une signalisation.

Comme discuté ci-haut, TFG semble détenir certaines propriétés dont la caractérisation pourrait permettre d'élucider comment la réponse antivirale s'organise et comment les voies de transport intracellulaire de protéine serait en mesure d'orchestrer et de synchroniser la réponse immunitaire innée antivirale. Étant donné les rôles antérieurs de TFG et l'obtention de l'interactome de TRAF3, nous posons l'hypothèse que TFG interagit avec TRAF3 de manière à faciliter l'activation de la voie canonique des RLRs en permettant le rapprochement entre TRAF3, son adaptateur MAVS, et son effecteur TBK1 (chapitre 2, figure 1).



**Figure 1 : Hypothèse de recherche du rôle potentiel de TFG dans la voie des RLRs.**

En établissant un contact étroit avec TRAF3, TFG pourrait catalyser le rapprochement activateur entre TRAF3 et ses partenaires de signalisation de manière à favoriser la production d'IFNs de type I et d'ISGs. Le modèle a été créé en utilisant les gabarits de Servier Medical Art sous une licence non restrictive CCBY 3.0 (<https://smart.servier.com/>).

**2.2.1 OBJECTIF 1 : CONFIRMATION DE L'INTERACTION ENTRE TFG ET TRAF3, ET DÉTERMINATION DE LA LOCALISATION SOUS-CELLULAIRE DE TFG**

**2.2.2 OBJECTIF 2 : DÉTERMINATION DU RÔLE DE TFG DANS L'ORGANISATION ET LA FORMATION DE COMPLEXES PROTÉIQUES SIGNALÉTIQUES.**

**2.2.3 OBJECTIF 3 : CARACTÉRISATION DU RÔLE FONCTIONNEL DE TFG DANS LA RÉPONSE ANTIVIRALE INNÉE**

## **CHAPITRE 3 – CARACTÉRISATION DU RÔLE DE TRK-FUSED GENE (TFG) DANS L'IMMUNITÉ INNÉE ANTIVIRALE.**

### **3.1 ARTICLE : TRK-FUSED GENE (TFG), A PROTEIN INVOLVED IN PROTEIN SECRETION PATHWAYS, IS ESSENTIAL FOR THE EFFICIENT ORGANIZATION OF THE INNATE ANTIVIRAL RESPONSE.**

#### **3.1.1 CONTRIBUTIONS**

Alexandre Marineau

- Formulation d'hypothèses
- Conception et optimisation des protocoles expérimentaux
- Réalisation des expérimentations
- Analyse des données
- Rédaction entière du manuscrit

Kashif Aziz Khan

- Formulation d'hypothèses
- Aide à la conception et l'optimisation de l'essai d'ELISA

Anne-Claude Gingras

- Partenaire dans l'accomplissement des expérimentations d'AP MS/MS ayant mené à l'identification de TFG en tant que partenaire potentiel de TRAF3.
- Révision du manuscrit

Marc Servant

- Supervision du projet
- Révision du manuscrit

#### **3.1.2 STATUT DE LA PUBLICATION**

- Non publié, en préparation pour soumission

## **TRK-Fused Gene (TFG), a protein involved in protein secretion pathways, is an essential component of the antiviral innate immune response**

Alexandre Marineau<sup>1</sup>, Kashif Aziz Khan<sup>1\*</sup>, Anne-Claude Gingras<sup>2</sup> and Marc J Servant<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> *Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Canada*

<sup>2</sup> *Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute at Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada;  
Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada*

**Running title: TFG is essential for an optimal antiviral response**

#Address correspondence to Marc J Servant, [marc.servant@umontreal.ca](mailto:marc.servant@umontreal.ca)

\*Present address: Kashif Aziz Khan, Department of Biology, York University, Toronto, Ontario, Canada

Word count abstract: 148

Word count importance: 149

Word count manuscript: 5 410



## **ABSTRACT**

Antiviral innate immune response to RNA virus infection is supported by Pattern-Recognition Receptors (PRR) including RIG-I-Like Receptors (RLR), which lead to type I interferons (IFNs) and IFN-stimulated genes (ISG) production. Upon sensing of viral RNA, the E3 ubiquitin ligase TNF Receptor-Associated Factor-3 (TRAF3) is recruited along with its substrate TANK-Binding Kinase (TBK1), to MAVS-containing subcellular compartments, including mitochondria, peroxisomes, and the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM). However, regulation of such events remains largely unresolved. Here, we identify TFG, a protein involved in COPII-coated vesicle biogenesis, as a new TRAF3-interacting protein allowing the efficient recruitment of TRAF3 to MAVS and TBK1 upon RLR activation following Sendai virus infection. Silencing its expression also compromised virus-induced phosphorylation of TBK1 on Ser172, activation of IRF3 and production of ISGs and IFN- $\beta$  resulting in a decreased antiviral state. Our study therefore identifies TFG as an essential component of type I IFN antiviral response.

## **IMPORTANCE**

The type I interferons response represents a key signaling events leading to potent antiviral state. As such, deciphering the roles of new regulators of innate immunity could transform the antiviral treatment paradigm by introducing novel panviral therapeutics designed to reinforce antiviral host responses. However, aberrant activation of such pathways can lead to detrimental consequences, including autoimmune diseases. Regulation of type I IFN responses is thus of paramount importance. To prevent an uncontrolled response, signaling events happen in discrete subcellular compartments therefore distinguishing sites involved in recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and those permitting downstream signaling. Here, we show TFG as a new regulator of type IFN allowing efficient organization of downstream effectors of RLR signaling. Through its roles in intracellular secretory pathway, TFG thus further substantiates the importance of the protein trafficking machinery in the regulation of optimal antiviral responses. Our findings have implications for both antiviral immunity and autoimmune diseases.

## INTRODUCTION

The cellular antiviral innate immune response against invading pathogens represents a critical step in maintaining cell homeostasis and host survival. Thus, understanding molecular determinants governing the optimal organization of the antiviral innate immune response remains essential to identify novel cellular targets for future antiviral or autoimmune therapies.

Generally, the establishment of such potent antiviral response relies on the detection of viral nucleic acid by evolutionarily conserved pattern-recognition receptors (PRRs) (1, 2). The recognition of viral components by PRRs triggers multiple pathways that culminate in the activation of multiple latent transcription factors, including interferons regulatory factor 3 (IRF3), as well as nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (3). These transcription factors directly enable the expression of several immunomodulatory genes, including the type I interferons (IFNs- $\alpha$  and IFN- $\beta$ ) and IFNs-stimulated genes (ISGs) that disrupt viral replication and dissemination, and mobilize adaptive immunity (4). Interestingly, only a subset of PRRs can lead to the synthesis of type I IFNs and subsequent expression of ISGs. These receptors include the endosome localized Toll-like receptors (TLRs) TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, the cytosolic cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) as well as retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs), RIG-I, and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) (5-8). Yet, even if these TLRs are involved in the detection of extracellular viral nucleic acids of key immune cells, most other cell types, such as epithelial cells and fibroblasts, rely mainly on cytosolic RLRs to sense RNA replication intermediates (9-11).

RIG-I and MDA-5 are closely related proteins that belong to the DExD/H Box helicase family and represent the most important cytoplasmic sensors for viral RNA (6). Specifically, RIG-I is a sensor for 5'-triphosphate-containing short double-stranded (ds)RNA structures from various single-stranded (ss)RNA viruses including *Sendai virus* (SeV), *hepatitis C virus* (HCV), *vesicular stomatitis virus* (VSV) and *influenza virus* (12). On the other hand, whereas MDA5 seems to detect long dsRNA molecules from different families of viruses such as *Picornaviridae*, *Calciviridae*,

*Coronaviridae*, it shares many ligands with RIG-I, such as the synthetic polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)) and members of the *Reoviridae*, the *Flaviridae* and the *Paramyxoviridae* (including SeV) families (13, 14). Upon binding to viral RNA, RIG-I and MDA-5 are recruited to the adaptor protein known as mitochondrial antiviral signaling (MAVS) through homotypic interactions between their caspase recruitment domains (CARDs) (15). RIG-I-MAVS interaction leads to the recruitment of different signaling effectors, thus creating a macromolecular signalosome complex that eventually culminates in the activation of IRF3 (15-19). In fact, this activation of IRF3 relies on the recruitment of an initial complex onto MAVS composed minimally of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors (TRAF) family member TRAF3, NEMO and TANK, which control the activity of the IKK-related kinase TBK1 (20, 21). Indeed, gene deletion studies have identified TRAF3 as an essential component for the activating trans-autophosphorylation of TBK1 on Ser172 enabling it to directly phosphorylate IRF3 on Ser396 and Ser402 (22, 23). In summary, much has been learned about effectors of RLR pathways. However, much less is known regarding how such effectors are functionally recruited to one another to initiate rapid and efficient signalling following RLR engagement. This understanding could help to understand the way antiviral networks are incorporated into cellular substructures and stimulate new paradigms in the field of innate immunity.

Recent studies support the role of subcellular synapses, consisting in physical contact sites between organelles, in establishing scaffolds for signal transduction in antiviral immunity. The first evidence that cytosolic RLR signaling may propagate from such interrelated organelles came from studies of MAVS, a transmembrane adaptor with diverse subcellular localization including mitochondria, peroxisomes and mitochondrial-associated ER membrane (MAM), an interface between mitochondria and the ER (24-26). Depending on its subcellular localization, it has been proposed that MAVS could sustain different signaling pathways (26). Moreover, the discovery of new MAVS-interacting type I IFNs mediators, such as STING suggested a role for the ER and the protein transport system in innate immunity. Indeed, STING was shown to translocate from the ER to the Golgi apparatus to eventually associate with TBK1 in

cytoplasmic punctae (27-29). In line with these observations, we previously showed that TRAF3 localizes with components of the ER-to-Golgi compartment upon infection (30). Nevertheless, how cells allow downstream effectors, such as TRAF3, to be recruited to such functional antiviral subcellular synapses remains largely unresolved.

We sought to determine the mechanism underlying the recruitment of the ER-resident TRAF3 to membrane-bound MAVS upon viral infection.

Here, our group identified a new role for the intracellular secretory pathway component, TRK-Fused Gene (TFG), as a TRAF3-interacting protein that positively regulates the RLR-dependent type I IFN antiviral response. TFG was first identified as a fusion partner of the nerve growth factor (NGF) receptor (NTRK1) that generates the papillary thyroid TRK-T3 oncogene (31). While its molecular function is not completely characterized, TFG was previously shown to function in intracellular protein trafficking (32-34). Our results detail the functional role of TFG in innate immunity as an ER-to-Golgi resident protein whose presence on the interface between the ER-to-Golgi and the mitochondria allows TRAF3 to interact with MAVS and TBK1 upon viral infection.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture, Reagents and Antibodies**

Human cervical adenocarcinoma (HeLa), human embryonic kidney (HEK) 293T and primary human fetal lung fibroblast (MRC-5) cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were maintained according to ATCC's guidelines. HEK293T cells were cultured in high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cat# 11995-065; Invitrogen) containing 4 mM L-Glutamine (Cat# G7513, Sigma), HeLa cells were maintained in low glucose DMEM (Cat# 11885-084; Invitrogen), MRC-5 fibroblasts were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Cat# 11095-080; Invitrogen) complemented to 0.1 mM non-essential amino acid (Cat# 11140-050; Invitrogen) and to 1 mM sodium pyruvate (Cat# 11360-070; Invitrogen). All media were supplemented with heat inactivated foetal bovine serum FBS-HI until a concentration of 10% was obtained (Cat# 16000-044; Invitrogen).

Poly (I:C) (GE HealthCare) was transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's protocol at final concentrations of 1.0 µg/mL. Polybrene and Puromycin were purchased from Sigma.

Antibodies were obtained from indicated companies: anti-TFG (Cat# IMG-5901A; Novus Biologicals), anti-FLAG M2 (Cat# F3165; Sigma), polyclonal anti-FLAG (F7125; Sigma), anti-Myc 9E10 (Cat# sc-40; Santa Cruz Biotechnology), anti-Myc A-14 (Cat# sc-789; Santa Cruz Biotechnology), anti-Sec31A (Cat# 612350; BD Biosciences), anti-ERGIC53 (Cat# 804-602-C100; Enzo Life Sciences), anti-GM130 (Cat# 610822; BD Transduction), anti-EEA1 (Cat# 610456; BD Transduction), anti-Sec16A (Cat# A300-648A; Bethyl Laboratories), anti-MAVS (Cat# ALX-804-847; Enzo Life Sciences), anti-TRAF3 G-6 (Cat# sc-6933; Santa Cruz Biotechnology), anti-TRAF3 H-20 (Cat# sc-948; Santa Cruz Biotechnology) anti-p-TBK1 Ser172 (Cat# 5483, Cell Signaling), anti-TBK1 (Cat# IMG-270A; Novus Biologicals), anti-p-IRF3 Ser396 (Cat# 4947; Cell Signaling), anti-IRF3 C-20 (Cat# sc-15991; Santa Cruz Biotechnology), anti-ISG15 (Cat# 2743; Cell Signaling), anti-ISG54 (Cat# NBP1-31164; Novus Biologicals), anti-ISG56 (Cat# NBP1-32329; Novus Biologicals), anti-β-

actin (Cat# A2228; Sigma), anti- $\alpha$ -Tubulin (Cat# T6199; Sigma), anti-GFP (Cat# G8965-22C; ABCAM), anti-mouse HRP-conjugated secondary antibodies (Cat# 074-1806; KPL), anti-rabbit HRP-conjugated antibodies (Cat# 074-1506; KPL), anti-goat HRP-conjugated antibodies (Cat# 01-13-06; KPL), alexa 488-conjugated anti-mouse antibodies (Cat# A11001; Invitrogen) and alexa 568-conjugated anti-rabbit antibodies (Cat# A10042; Invitrogen).

### **Plasmids constructs, transfections and infections**

Plasmids encoding FLAG-TFG and Myc-TFG were produced from TFG cDNAs. In fact, TFG cDNAs were first amplified from the MGC bank collection and then subcloned in pTag2B (FLAG) or pTag3B (Myc) vectors. FLAG-TRAF3 and Myc-TRAF3, FLAG-TRAF2 and FLAG-TRAF6 were obtained as previously described (30).

HEK293T cells transfections were carried out using calcium-phosphate precipitation method. HeLa cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's protocol.

Sendai virus (SeV) was obtained from Specific Pathogen-Free Avian Supply (Charles River Laboratories). Cells were infected respecting the ratio of 100 HAU/10<sup>6</sup> cells. GFP-expressing VSV (VSV-GFP, kindly provided by Dr. Benjamin tenOever, Mount Sinai Hospital, New York, NY, USA) was propagated in Vero cells and quantified by standard plaque assay as described here (35), and used at corresponding multiplicity of infection (MOI).

### **Protein extraction, Immunoprecipitation, Gel Electrophoresis and Immunoblot analysis**

Proteins from whole cell extracts (WCE) were obtained by resuspending cells in conventional Triton X-100 lysis buffer complemented with protease inhibitors (50 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl; 50 mM NaF; 5 mM EDTA; 10% glycerol; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate; 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 5  $\mu$ g/ml of leupeptin, pepstatin, and aprotinin; 1% Triton X-100) for 30 minutes on ice before being centrifuged and harvested. Proteins from WCE were quantified by Bradford protein assay (BioRad) according to manufacturer's protocol.

For co-immunoprecipitation assay, 1 mg of WCE were incubated with 1  $\mu$ g of antibody at 4°C overnight on rotating wheel, while 40  $\mu$ l of protein A- or Q-Sepharose beads suspension were blocked with 1% BSA buffer. Lysates were then immunoprecipitated with corresponding sepharose beads at 4°C for 3 hours. After five washes with protease inhibitors complemented lysis buffer, immune complexes were recovered from beads with 50  $\mu$ l 2X sample buffer before analysis by SDS-PAGE and immunoblotting.

Immunoblots were accomplished according to previously described procedures (36). Succinctly, WCE (50  $\mu$ g) were prepared in 1x sample buffer and separated using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method and a SE400 electrophoresis apparatus (GE Health Care). The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (BioTrace NT) using Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) according to manufacturers protocol. Nitrocellulose membranes were then incubated with 5% milk or 5% bovine serum albumin (BSA; for detection of phosphorylated proteins) for 1h to prevent non-specific binding of antibodies. The membranes were probed with primary antibodies followed by HRP-conjugated secondary antibodies raised against the appropriate species diluted in blocking buffer at a final concentration recommended by manufacturers. Bands were detected with the Western Lightning ECL kit (Perkin-Elmer).

For Native-PAGE analysis, non-denaturing (without SDS) conditions were used. 7.5% native polyacrylamide gels were prerun using only 25 mM Tris and 192 mM glycine buffer with corrected-pH of 8.4 in the anode chamber, but containing also 1% deoxycholate in the cathode chamber for 30 minutes at 40 mA. WCE (20  $\mu$ g) were diluted in native sample buffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 15% glycerol, and bromophenol blue) and ran into native gel for 3 hours at 25 mA using the SE400 electrophoresis apparatus. Transfer and immunoblotting was accomplished as mentioned above.

### **Confocal microscopy**

Confocal microscopy immunocytofluorescence experiments were accomplished as previously described by us (30). Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde



(PFA) in PBS for 20 min before being permeabilized through 5-minute treatment with 0.1% Triton X-100. Cells were then washed with PBS (pH 7.2) and blocked with 0.5% BSA in PBS before being probed with primary antibodies and subsequent secondary fluorophore-conjugated antiserum (Alexa Fluor 488 and 564). Control experiment followed the exact same steps but were not subjected to the primary antibodies. Anti-FLAG antibody (M2, Sigma) was used at 1:1000, anti-FLAG polyclonal antibody; 1:400, anti-Myc 9E10; 1:100, anti-Sec31A; 1:100, anti-ERGIC53; 1:100, anti-GM130; 1:100, anti-EEA1; 1:100, anti-Sec16A; 1:200, and anti-MAVS; 1:100. Secondary fluorophore-conjugated antiserum (Alexa Fluor 488 and 564) were used at 1:500 in PBS 0.5% BSA. The nucleus was labeled by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. The confocal micrographs represent a single optical section (Z-stack) of cells which was sequentially scanned for different fluorophores. Images were acquired from a LSM 510 inverted microscope (Zeiss) combined to LSM v3.2 software (Zeiss).

### **RNA interference, lentiviral vector production and transduction**

ON-TARGETplus siRNA against TFG mRNA (siTFG) and the non-targeting control (siNT) were purchased from Dharmacon. siRNA targeting the open reading frame are as follow: siTFG #1 (Cat# J-016366-08-0002), siTFG #2 (Cat# J-016366-07-0002), siTFG #3 (Cat# J-016366-06-0002), siTFG #4 (Cat# J-016366-05-0002). Cells were transfected with 40 nM siRNA using Lipofectamine 2000 at a final concentration of 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and maintained in culture for 72 hours before analyzing cell extracts. The RNAi Consortium (TRC)/ Mission shRNA lentiviral vectors targeting TFG (#1: TRCN0000078658; #2: TRCN0000078660; #3: TRCN0000311703) and non-targeting control (shNT: SHC002) shRNA were purchased from Sigma. Lentiviral vector production was conducted in 293T cells. Cells ( $3.5 \times 10^6$  in 100mm dish) were transfected with 6  $\mu\text{g}$  of non-targeting control, specific shRNA along with 1.5  $\mu\text{g}$  pMDLg/pRRE, 1.5  $\mu\text{g}$  pRSV-REV, and 3  $\mu\text{g}$  pVSVg. 16 hours post-transfection, medium was replaced before being harvested the next day. Medium containing lentivirus was then filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  filter and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Lentiviral titers were determined by limiting dilution assay using HeLa cells as described (37). MRC-5 were infected with lentivirus at an MOI of 5 for 24h in the presence of 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$

polybrene followed by puromycin selection for 3 days (2 µg/ml) before further manipulation.

## **ELISA**

IFN-β production and secretion in supernatants was determined using the Verikine human IFN beta ELISA kit (Cat # 41410, PBL Assay Science) according to manufacturer's instructions.

## **VSV-GFP Antiviral Assay and Flow Cytometry Analysis**

The antiviral state of cells following TFG knockdown was measured by VSV-GFP reporter virus replication as described previously (38). Briefly, cells were infected with VSV-GFP and cells were inspected and photographed using an inverted fluorescence microscope (Zeiss, Goettingen, Germany) 16h post-infection. Moreover, VSV-GFP infected cells were trypsinized and either harvested for immunoblot analysis or fixed with 2% paraformaldehyde in PBS. Uninfected and VSV-GFP-infected MRC-5 fibroblasts treated with lentiviral vectors encoding a nontargeting (NT) shRNA (shNT) were used as control. The fluorescence intensity was quantified and percentage of GFP-positive cells were determined by flow cytometry using FACS caliber (BD Bioscience) combined with the BD FACSDiva software.

## **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0. Comparison of two groups was carried out using a two-tailed *t*-test, and comparison of more than two groups was evaluated with one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison post-test was used. Differences were considered significant at a P-value below 0,05.

## RESULTS

### TFG interacts specifically with TRAF3

Our group previously identified probable TRAF3-interacting proteins that could be implicated in antiviral innate immunity through a functional proteomics approach based on FLAG affinity purification and mass spectrometry analysis (AP-MS), and functionally characterized an interaction between TRAF3, Sec16A and USO1 (also known as p115), components of the ER-to-Golgi vesicular pathway (30). However, besides the well-known TRAF3 interactors TBK1, TFG was identified as the most prevalent protein in TRAF3-immunocomplexes (Fig. 1A).

Therefore, to confirm the physical interaction between TRAF3 and TFG, we performed coimmunoprecipitation experiments. We found that ectopically expressed tagged versions of TFG were part of immunocomplexes containing TRAF3 in human embryonic kidney (HEK) 293T cells (Fig. 1B, C). To further substantiate the subcellular proximity between these proteins in a context in which cell integrity is not altered, confocal microscopy experiments were executed. Myc-TFG indeed colocalized with FLAG-TRAF3 in HeLa cells (Fig. 1D).

The adaptor proteins from the TRAF family are known regulators of multiple receptors including TNFR, interleukin-1 receptor (IL1R), and TLRs. They are known to bridge intracellular domains of these receptors to downstream effectors in the inflammatory and innate immune signaling pathways. TRAFs contain a C-terminal TRAF domain, and often share common interacting partners. Indeed, TRAF2, TRAF3 and TRAF6 were shown to interact with MAVS (19, 21, 39, 40). Consequently, to verify the possible binding of TFG with other members of the TRAF family, we coimmunoprecipitated ectopically-expressed Myc-TFG along with FLAG-tagged TRAF2, TRAF3 or TRAF6 in HEK293T. Only FLAG-TRAF3 was recovered from Myc-TFG complexes thereby confirming the selectivity of their interaction (Fig. 1C). Thus, TFG seems to accumulate in a perinuclear region (Fig. 1D) where it can specifically interact with TRAF3.

## **TFG localizes on the ER-to-Golgi compartments and is part of MAVS-TRAF3-TBK1 molecular complex**

Our group recently observed that TRAF3 mainly colocalizes with markers of the ER-Exit-Sites (ERES), ER-to-Golgi intermediate compartment (ERGIC) and the cis-Golgi apparatus (30). To further define the subcellular organization of TFG, we performed another set of confocal microscopy experiments between TFG and different markers of perinuclear compartments at the endogenous level (Fig. 2). TFG was recently shown to localize on the ER-to-Golgi compartments where it interacts with Sec16A to control the export of cargoes from the endoplasmic reticulum (32-34). We were able to further substantiate these observations by co-labeling HeLa cells with polyclonal anti-TFG antibodies and monoclonal antibodies directed against endogenous markers for sites of COPII vesicle formation on the ERES, namely Sec16A and Sec31A, but also with ERGIC-53, which accumulates on ERGIC (Fig. 2A and B) (41-43). Additionally, a fraction of native TFG is also found to overlap with the cis-Golgi marker GM130 and the early endosome marker EEA1 (Fig. 2A) (44, 45). Interestingly, the colocalization between FLAG-tagged TFG and endogenous Sec16A seems to be maintained upon SeV infection (Fig. 2B). Of note, subcellular colocalization of endogenous Sec16A and TFG following SeV infection appears more dispersed than in uninfected conditions. This observation is in agreement with previous results showing an increased COPII vesicle budding and a more diffuse cytosolic localization of Sec16A following Poliovirus infection (46).

As aforementioned, TRAF3 is an essential player of the type I IFN arm of the RLR-dependant antiviral response. Upon viral infection, together with TBK1, TRAF3 transits from the perinuclear region onto MAVS-containing supramolecular complexes and promotes signaling events leading to TBK1 activation (25, 30, 47, 48). Therefore, we next determined the effect of viral infection on the interaction between TFG and TRAF3. To do so, we first evaluated endogenous TFG localization in HeLa cells expressing FLAG-TRAF3 with or without SeV infection. As expected, FLAG-TRAF3 colocalized with endogenous TFG, an interaction that was maintained after viral infection (Fig. 3A). Exogenous overexpression of tagged-proteins can overwhelm the

trafficking machinery, potentially affecting subcellular dispersion of proteins and leading to their mislocalization (49). We therefore also performed co-immunoprecipitation of the endogenous proteins to further characterize the dynamics of interaction between TFG and TRAF3 upon viral infection. Interestingly, upon SeV infection, TRAF3 recruitment to TFG-containing immunocomplexes was further increased compared to that in uninfected cells (Fig. 3B). Additionally, the TRAF3 substrate TBK1 was also recruited to TFG upon viral infection (Fig. 3B). Consistent with previous studies (50, 51), we found that infection of HEK 293T cells with SeV enhanced the interaction between TRAF3 with both its upstream regulator MAVS and downstream effector TBK1 (Fig. 3C). Interestingly, the kinetics of the interaction between TRAF3 and TBK1 admits the presence of a preformed TRAF3-TBK1-TFG (Fig. 3B) complex that is recruited to MAVS afterwards (Fig. 3C). This is consistent with the previous findings that MAVS recruits preformed TBK1-TRAFs complexes (52).

We next sought to determine if TFG could be part of TRAF3-containing signaling platform near MAVS. To do so, we performed confocal microscopy experiments between endogenous TFG and MAVS to assess their possible proximity within the cell. Interestingly, a pool of TFG appeared to be near MAVS, probably on an interface between the ER and mitochondria, in uninfected cells (Fig. 3D). Of note, upon stimulation with poly(I:C), a potent ligand for RLR, MAVS polymerized into dense punctae compared to mock infected cells (Fig. 3D) (53). Interestingly, a subpopulation of TFG also appeared to be loaded on a subset of these punctae, thereby suggesting that TFG could be part of MAVS signalosome complex interacting with not only TRAF3 and TBK1 but also MAVS. In summary, our data suggest that TFG localizes with COPII vesicles markers, which transit from the ERES to the ERGIC en route to cis-Golgi compartments. In summary, our data suggest that TFG localizes with COPII vesicles markers, which transit from the ERES to the ERGIC en route to cis-Golgi compartments (54), but also with the mitochondria where it could regulate antiviral signalling events owing to its ability to interact with TBK1 and TRAF3.

## **TFG is essential for the formation of the MAVS-TRAF3-TBK1 complex and activation of IRF3 upon RLR activation.**

We next tested whether TFG could be involved in the organization of MAVS signalosome networks upon viral infection. To this end, we examined the ability of TRAF3 to interact with both MAVS and TBK1 upon viral infection in HEK293T cells in which endogenous TFG was knocked down with a TFG-specific short interfering RNA (siRNA, siTFG). Cells transfected and expressing a non-targeting control siRNA (siNT) served as control. Depletion of endogenous TFG by two unrelated siRNAs reduced the extent of recruitment of TRAF3 to MAVS and TBK1 triggered by SeV infection (Fig. 4, A and B). Moreover, consistent with previous reports showing the recruitment of TRAF3 to MAVS as an important process leading to downstream signaling, the silencing of TFG also blunted the activating autotransphosphorylation of TBK1 on Ser172 (p-TBK1 S172) normally observed upon viral infection (Fig. 4B).

As mentioned previously, IRF3 is a critical mediator of type I interferons response following viral infection. In order to evaluate more precisely the role of TFG in downstream signaling of TRAF3, we followed post-translational modifications of TBK1 and IRF3 as biomarkers of their activity. TFG knockdown led to a diminution of SeV-induced phosphorylation of TBK1 and homodimerization of IRF3 compared to siNT treated HeLa cells (Fig. 4C). To further confirm the involvement of TFG in regulating TBK1 and IRF3 activation in a primary cell type, we used non-transformed MRC5 primary fibroblasts in which endogenous TFG was selectively knocked down using a short hairpin RNA (shRNA) approach (shTFG). Importantly, altering the expression of TFG by different unrelated shRNA constructs lead to a decrease in the SeV-induced phosphorylation of both TBK1 (S172) and its substrate IRF3 (S396) (Fig. 4D). Interestingly, concordantly with the lower knockdown efficiency of shTFG #2, its effect on the phosphorylation of IRF3 was inferior compared to shTFG #1 and #3. Together, these results suggest that TFG sustains RLR-signaling pathways by enabling an efficient organization of important mediators that ultimately leads to IRF3 activation.

## **TFG expression is required for an effective production of ISGs and IFN- $\beta$ secretion.**

IRF3 plays a significant role in host survival following viral infection (55, 56). Indeed, besides its essential role in the induction of IFN- $\beta$ , IRF3 contributes to the expression of different antiviral proteins, including ISG15, ISG54, ISG56 by binding to interferons-sensitive response elements (ISRE) present within the promotor region of these genes (57-59).

Since TFG affects IRF3 activation, we further substantiated the function of TFG by measuring the expression of these IRF3-regulated antiviral ISGs in virally infected cells via western blot analysis. Infection of HeLa cells with SeV led to the generation of detectable amounts of ISG15, ISG54 and ISG56 proteins (Fig 5, A and B). Notably, virally induced ISG15, ISG54 and ISG56 expression was severely compromised when knocking down TFG by siRNA compared to that in infected cells transfected with siNT (Fig. 5A). To corroborate this finding, IFN- $\beta$  production was evaluated by ELISA in cells lacking TFG. Upon virus infection, siRNA-mediated silencing of TFG in HeLa cells markedly decreased production and secretion of IFN- $\beta$  (Fig. 5B). Consistently, induction of IRF3-regulated genes ISG54, ISG56 in response to SeV infection was decreased following the knockdown of TFG by three different shRNA construct in primary MRC5 fibroblasts (Fig. 4D). Importantly, this reduction correlated with the knockdown efficiency of shTFG constructs. Thus, TFG expression in cells is important for the production of antiviral proteins following viral infection.

## **Knockdown of TFG favors VSV replication and dissemination.**

The prior data suggest that TFG plays a crucial role in type I IFN response mediated by RLR. To directly determine the role of TFG in type I IFN-mediated antiviral immune response, we tested the importance of TFG expression on the replication of VSV, which is sensed by RIG-I (14). In fact, by using a functional antiviral assay involving a modified version of VSV expressing a GFP-tagged protein (VSV-GFP), it is possible to monitor the extent of viral replication and infection. HeLa cells in which TFG was

silenced using four different siRNA exhibited substantially enhanced VSV-GFP infection rates compared to those of cells expressing siNT, as shown in fluorescence microscopy (Fig. 6A). Using one of the silencing RNA duplexes, the observed decrease in the antiviral response in fluorescence microscopy or semi-quantitative western blot analysis was reproduced using different multiplicity of infection (MOI) (Fig. 6B). Similarly, primary MRC5 fibroblasts expressing different TFG-targeting shRNAs were more sensitive to VSV challenge (Fig. 6C). In summary, these loss-of-function experiments suggest that TFG organizes an adequate antiviral response through its interaction with different players of the antiviral response.



## DISCUSSION

The RIG-I-MAVS-TRAF3 axis is recognized as a fundamental signaling pathway leading to rapid and potent antiviral host response to viral infection. An emerging paradigm proposes that RLRs are dependent on the cellular trafficking machinery to link virus sensing sites to signal transducing hub within the cell (60, 61). Illustrating this concept is the RLR-archetype protein, RIG-I that has to translocate from cytosolic compartment to MAVS-containing complexes to efficiently signal. This process is initiated by K63-linked ubiquitination of RIG-I by the E3 ubiquitin ligases Riplet and TRIM25 (62, 63). Next, ubiquitinated RIG-I redistributes to membrane compartments mediated by the cytosolic chaperone 14-3-3 $\epsilon$ . Thus, it has been proposed that RIG-I, TRIM25 and 14-3-3 $\epsilon$  form a translocation complex allowing the recruitment of RIG-I to MAVS (62). Whereas this regulated transport of RLRs to their cognate sorting adaptors represents a new critical checkpoint for innate immune signal transduction, much less is known concerning events leading to the recruitment and the organization of downstream effectors. Here, we present the role of TFG as an essential component of MAVS-TRAF3 signaling complex whose subcellular localization allows efficient recruitment of TRAF3 to its upstream adaptor MAVS, permitting the activation IRF3 and subsequent expression of type I IFNs and ISGs. Whereas conflicting reports failed to present compelling results regarding TFG's role in innate immunity (64, 65), our study proposes a positive molecular role of TFG in organizing antiviral responses upon RLR activation.

Using both the transformed HeLa cell line and the primary lung fibroblasts MRC5 cell line in which TFG was depleted by siRNA and shRNA approaches, respectively, we confirmed the importance of TFG expression in the ability of cells to prevent VSV replication and dissemination. Since VSV is a well-established IFN-sensitive virus (66, 67), this suggests a role for TFG in IFN response. Confirming this notion, ELISA experiments showed the critical role of TFG in IFN- $\beta$  expression/secretion. Likewise, in both TFG-depleted HeLa and MRC5 cells, subsets of IRF3-regulated ISGs production following SeV infection was decreased compared to their cognate TFG-expressing controls. As such, these experiments using the RIG-

I-sensed VSV and SeV reveal a potential role of TFG in RLR signaling pathways. However, the precise level at which TFG plays its role was still unknown. Previous study identified TRIM25 as a TFG-interacting partner suggesting a role of TFG in RIG-I mediated signalling (64). Interestingly, whereas the K63-linked ubiquitin ligase activity of TRIM25 is important for RIG-I activation and subsequent interaction with MAVS, TRIM25 can also promote K48-linked ubiquitination and degradation of target proteins, including MAVS (68-70). Importantly, studies have shown that during RNA virus infection, expression of MAVS diminishes over time (26, 68). Paradoxically, this loss of MAVS expression appears to positively regulate antiviral signaling, as this loss immediately precedes phosphorylation of IRF3. Nevertheless, even though TFG interacts with TRIM25, it appears to play downstream from MAVS activation. Indeed, MAVS degradation upon SeV infection was unchanged upon TFG silencing in HeLa cells (Fig. 4A). On the other hand, TFG-depletion directly affected the autotransphosphorylation of TBK1 on S172 and subsequent IRF3 activation, thereby proposing a role for TFG in RLR pathway downstream MAVS signaling (Fig. 4, B, C and D). Moreover, knockdown of TFG in HeLa cells affected TBK1 phosphorylation, but not MAVS expression in conditions where MAVS degradation was avoided by pretreatment of cells with the proteasome inhibitor MG132 (data not shown). Altogether, these observations results suggest that TFG acts downstream of MAVS activation and degradation.

RIG-I-MAVS interaction leads to the recruitment of members of the TRAF adapter family, including TRAF3, to favour IRF3-driven antiviral response (20). In addition to TRAF3, several proteins, such as NEMO, TANK and TBK1, have been reported to be critical regulators of MAVS-dependent IRF3 phosphorylation and type I IFN production (22, 50, 71, 72). TBK1 has robust autophosphorylation capabilities and functions in multiple signaling pathways, including type I IFN antiviral response and autophagy (73-75). Growing evidence also revealed the aberrant TBK1 activity in a variety of autoimmune diseases and cancers (76, 77). As such, numerous regulatory mechanisms exist to prevent TBK1 activation in absence of pathway stimulation (75). The main molecular event that controls TBK1 activity is the phosphorylation of the catalytic serine residue in the activation T-loop at position 172

(Ser172) (78, 79). Existing in dimeric assembly in a configuration limiting its autophosphorylation, TBK1 requires K63-linked polyubiquitination modification to become active (80-82). In RLR signaling, several E3 ligases were shown to be involved in such ubiquitination, including TRAF3 (47). Hence, upon viral infection, TBK1 gets recruited to TRAF3-containing signaling complexes, undergoes K63-linked polyubiquitin posttranslational modifications allowing interdimer interactions that lead to transautophosphorylation of TBK1 on Ser172. Moreover, another regulatory mechanism controlling activation of TBK1 is the presence of scaffold proteins allowing the recruitment of TBK1 to TRAF3 (71, 80). In IFN- $\beta$  production, TRAF3-interacting scaffold protein TANK was shown to be essential in linking TBK1 to the MAVS complex (50). Similarly, NEMO binds ubiquitinated TBK1 to contribute to the formation of a functional signalosome (72). Although, TANK and NEMO are thought to be responsible for bringing TBK1 and TRAF3 together onto MAVS complex, how such movements of proteins are regulated remains unsolved. Here, we identified TFG as being part of a molecular complex comprised of at least TRAF3 and TBK1 (Fig. 3B). TFG expression is required for TBK1 recruitment to TRAF3 upon viral infection (Fig. 4). Of note, TFG was previously shown to physically interact with both TANK and NEMO, further implying a role of TFG in TBK1-mediated IRF3 activation (83). In addition to TRAF3, MAVS also recruits TRAF2 and TRAF6 ubiquitin ligases to support NF- $\kappa$ B-dependent inflammatory response (20). Supporting the specific involvement of TFG in IRF3 signaling is the fact that TFG lacks the ability to bind to overexpressed TRAF2 or TRAF6 (Fig. 1C). Nevertheless, since both TANK and NEMO are adaptor proteins promoting crosstalk between NF- $\kappa$ B and IRF signaling pathways (84-86) and given their interaction with TFG, a role of TFG in the activation of NF- $\kappa$ B cannot be excluded.

As previously stated, MAVS is a transmembrane protein localizing to different subcellular compartment including mitochondria and peroxisomes, as well as to the MAM (26, 61). Whereas MAVS localization to each of these signaling hubs is important, MAM was proposed to provide a dynamic framework allowing crosstalk between organelles leading to efficient organization of antiviral immune responses.

Intriguingly, TFG is an ER-to-Golgi resident protein (Fig. 2), and a TFG subpopulation also seems to be present on an interface between the ER and MAVS-containing organelles (Fig. 3D). MAM importance in RIG-I-dependent downstream signaling is supported by the fact that HCV proteases NS3/4A target MAM-bound MAVS, thereby blunting antiviral responses (25). Moreover, whereas RIG-I translocates from the cytosol to the membrane-rich compartment MAM, for MAVS binding, the ER-resident protein TRAF3 also traffics to MAM after viral infection (25). As abovementioned, studies reported a role of TFG in the secretory pathway, which controls the correct distribution of proteins within cells (33, 34). Indeed, TFG is involved in ER-derived COPII-coated vesicles biogenesis and controls their transit between the ER and ERGIC, a key sorting hub for secretory cargoes (33, 34). In fact, polymerization of TFG facilitates the assembly of the essential ERES protein Sec16A with other COPII subunits enabling an efficient export of proteins from the ER to other organelles (33, 34). Consistently, cells lacking TFG were unable to efficiently recruit TRAF3 to MAVS in order for them to interact upon RNA virus infection (Fig. 4A). In line with this observation, we previously identified Sec16A as an important protein enabling the recruitment of TRAF3 to MAVS upon viral infection (30). Importance of the secretory pathway is further underlined by the fact that certain viruses target COPII vesicle trafficking to impede innate immunity and favour viral replication. In fact, non-structural protein p22 homologs of different Noroviruses were shown to inhibit COPII vesicle trafficking, leading to Golgi dismantling and defect of Golgi-dependent cellular protein secretion (87, 88). Moreover, *E. coli*, picornaviruses and rotaviruses were also reported to disrupt the early secretory pathway, suggesting important roles for this system in global anti-microbial immunity (89).

Additionally, the membrane flux mediated by TFG is important for maintaining proper organelles organization. Notably, TFG depletion alters ER morphology and Golgi assembly, disorganizes ERGIC and Golgi networks (33, 90). Of note, the TFG-interacting Sec16B protein was shown to be important in the formation of peroxisome, further substantiating links between TFG, secretory pathway and the formation of signaling synapses where MAVS can orchestrate effective antiviral signaling events (33, 91). TFG-depleted cells also exhibit clustering of mitochondria instead of a more

dispersed pattern (90). Since MAM and peroxisomes are ER-regulated compartments (92-94), and that TFG seems to have an important role in assembling membrane-rich matrix allowing the movement and creation of such subcellular compartments, TFG could provide a docking platform where mitochondria, peroxisomes, MAM and ER tightly associates to create a signaling hub for antiviral responses. Taking into account these various effects of TFG on the secretory pathway and on maintaining proper subcellular configurations, the results obtained through the knockdown of TFG could reflect its effect on the underlying structures rather than in the direct organization of signaling complexes. We thus propose a model where TFG function as a structural protein allowing the formation of membrane-rich compartments between organelles necessary for the proper organization of signaling complexes culminating in robust type I IFN antiviral responses (Fig. 7).

This study proposes an important role for the ER-to-Golgi vesicular transport system protein TFG in allowing proper positioning of TRAF3 with MAVS leading to TBK1/IRF3-regulated antiviral signaling events. Structure-function assessment of TFG's role in innate immunity will help to understand the precise involvement of TFG in such movement of proteins within cells. More globally, future characterization of TFG's implication in other PRRs-regulated pathway will undoubtedly help to appreciate the importance of the secretory pathway in innate immunity, and autoimmune diseases.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to MJS (MOP-84571) and ACG (Foundation scheme). MJS and ACG hold Canada Research Chairs in Inflammatory Response Signaling and Functional Proteomics, respectively. AM is a recipient of scholarships from Canadian Institute of Health Research (CIHR), Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) and from the faculté des études supérieures et post-doctorale (FESP; Hydro-Québec excellency scholarship). KAK received a postdoctoral fellowship from the *Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament* (GRUM).

## REFERENCES:

1. Gurtler C, Bowie AG. Innate immune detection of microbial nucleic acids. *Trends in microbiology*. 2013;21(8):413-20.
2. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annual review of immunology*. 2011;29:185-214.
3. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 2011;30(1):16-34.
4. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology*. 2014;32:513-45.
5. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010;11(5):373-84.
6. Nakhaei P, Genin P, Civas A, Hiscott J. RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection. *Seminars in immunology*. 2009;21(4):215-22.
7. Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Current opinion in immunology*. 2015;32:48-53.
8. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 2013;339(6121):786-91.
9. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*. 2005;23(1):19-28.
10. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(22):8459-64.
11. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology*. 2004;5(7):730-7.
12. Kell AM, Gale M, Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*. 2015;479-480:110-21.
13. Iwasaki A. A virological view of innate immune recognition. *Annual review of microbiology*. 2012;66:177-96.
14. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006;441(7089):101-5.
15. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 2005;122(5):669-82.

16. Potter JA, Randall RE, Taylor GL. Crystal structure of human IPS-1/MAVS/VISA/Cardif caspase activation recruitment domain. *BMC structural biology*. 2008;8:11.
17. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology*. 2005;6(10):981-8.
18. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 2005;437(7062):1167-72.
19. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Molecular cell*. 2005;19(6):727-40.
20. Belgnaoui SM, Paz S, Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Current opinion in immunology*. 2011;23(5):564-72.
21. Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, et al. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *The EMBO journal*. 2006;25(14):3257-63.
22. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*. 2006;439(7073):208-11.
23. Servant MJ, Grandvaux N, tenOever BR, Duguay D, Lin R, Hiscott J. Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(11):9441-7.
24. Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, Shum B, et al. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell*. 2010;141(4):668-81.
25. Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M, Jr. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(35):14590-5.
26. Vazquez C, Horner SM. MAVS Coordination of Antiviral Innate Immunity. *Journal of virology*. 2015;89(14):6974-7.
27. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*. 2008;455(7213):674-8.
28. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(49):20842-6.



29. Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*. 2008;29(4):538-50.
30. van Zuylen WJ, Doyon P, Clement JF, Khan KA, D'Ambrosio LM, Do F, et al. Proteomic profiling of the TRAF3 interactome network reveals a new role for the ER-to-Golgi transport compartments in innate immunity. *PLoS pathogens*. 2012;8(7):e1002747.
31. Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M, et al. The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(11):6118-27.
32. Chen Y, Tseng SH. Targeting tropomyosin-receptor kinase fused gene in cancer. *Anticancer research*. 2014;34(4):1595-600.
33. Johnson A, Bhattacharya N, Hanna M, Pennington JG, Schuh AL, Wang L, et al. TFG clusters COPII-coated transport carriers and promotes early secretory pathway organization. *The EMBO journal*. 2015;34(6):811-27.
34. Witte K, Schuh AL, Hegemann J, Sarkeshik A, Mayers JR, Schwarze K, et al. TFG-1 function in protein secretion and oncogenesis. *Nature cell biology*. 2011;13(5):550-8.
35. tenOever BR, Sharma S, Zou W, Sun Q, Grandvaux N, Julkunen I, et al. Activation of TBK1 and IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *Journal of virology*. 2004;78(19):10636-49.
36. Khan KA, Do F, Marineau A, Doyon P, Clement JF, Woodgett JR, et al. Fine-Tuning of the RIG-I-Like Receptor/Interferon Regulatory Factor 3-Dependent Antiviral Innate Immune Response by the Glycogen Synthase Kinase 3/beta-Catenin Pathway. *Molecular and cellular biology*. 2015;35(17):3029-43.
37. Baril M, Es-Saad S, Chatel-Chaix L, Fink K, Pham T, Raymond VA, et al. Genome-wide RNAi screen reveals a new role of a WNT/CTNNB1 signaling pathway as negative regulator of virus-induced innate immune responses. *PLoS pathogens*. 2013;9(6):e1003416. Epub 2013/06/21.
38. Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, Forman J, et al. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity*. 2006;24(5):633-42. Epub 2006/05/23.
39. Paz S, Vilasco M, Werden SJ, Arguello M, Joseph-Pillai D, Zhao T, et al. A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response. *Cell research*. 2011;21(6):895-910.

40. Liu S, Chen J, Cai X, Wu J, Chen X, Wu YT, et al. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife*. 2013;2:e00785.
41. Hauri HP, Kappeler F, Andersson H, Appenzeller C. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *Journal of cell science*. 2000;113 ( Pt 4):587-96.
42. Hughes H, Budnik A, Schmidt K, Palmer KJ, Mantell J, Noakes C, et al. Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 16):2924-34.
43. Watson P, Townley AK, Koka P, Palmer KJ, Stephens DJ. Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic*. 2006;7(12):1678-87.
44. Dumas JJ, Merithew E, Sudharshan E, Rajamani D, Hayes S, Lawe D, et al. Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Molecular cell*. 2001;8(5):947-58.
45. Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, et al. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *The Journal of cell biology*. 1995;131(6 Pt 2):1715-26.
46. Trahey M, Oh HS, Cameron CE, Hay JC. Poliovirus infection transiently increases COPII vesicle budding. *Journal of virology*. 2012;86(18):9675-82.
47. Parvatiyar K, Barber GN, Harhaj EW. TAX1BP1 and A20 inhibit antiviral signaling by targeting TBK1-IKKi kinases. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(20):14999-5009.
48. Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PloS one*. 2013;8(12):e83639.
49. Iinuma T, Shiga A, Nakamoto K, O'Brien MB, Aridor M, Arimitsu N, et al. Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(24):17632-9.
50. Guo B, Cheng G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(16):11817-26.
51. Saha SK, Cheng G. TRAF3: a new regulator of type I interferons. *Cell cycle*. 2006;5(8):804-7.
52. Fang R, Jiang Q, Zhou X, Wang C, Guan Y, Tao J, et al. MAVS activates TBK1 and IKKepsilon through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLoS pathogens*. 2017;13(11):e1006720.
53. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 2011;146(3):448-61.

54. Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature*. 1997;389(6646):81-5.
55. Hiscott J. Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(21):15325-9.
56. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(9):644-58.
57. Andersen J, VanScoy S, Cheng TF, Gomez D, Reich NC. IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. *Genes and immunity*. 2008;9(2):168-75.
58. Lazear HM, Lancaster A, Wilkins C, Suthar MS, Huang A, Vick SC, et al. IRF-3, IRF-5, and IRF-7 coordinately regulate the type I IFN response in myeloid dendritic cells downstream of MAVS signaling. *PLoS pathogens*. 2013;9(1):e1003118.
59. Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, et al. Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *Journal of virology*. 2002;76(11):5532-9.
60. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(8):535-42.
61. Kagan JC. Signaling organelles of the innate immune system. *Cell*. 2012;151(6):1168-78.
62. Liu HM, Loo YM, Horner SM, Zornetzer GA, Katze MG, Gale M, Jr. The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3epsilon regulates a RIG-I translocon that mediates membrane association and innate antiviral immunity. *Cell host & microbe*. 2012;11(5):528-37.
63. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell host & microbe*. 2010;8(6):496-509.
64. Lee NR, Shin HB, Kim HI, Choi MS, Inn KS. Negative regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by TRK-fused gene (TFG) protein. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;437(1):168-72.
65. Wynne C, Lazzari E, Smith S, McCarthy EM, Ni Gabhann J, Kallal LE, et al. TRIM68 negatively regulates IFN-beta production by degrading TRK fused gene, a novel driver of IFN-beta downstream of anti-viral detection systems. *PLoS one*. 2014;9(7):e101503.
66. Balachandran S, Barber GN. Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer cell*. 2004;5(1):51-65.

67. Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, Paterson JM, Power AT, Knowles S, et al. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer cell*. 2003;4(4):263-75.
68. Castanier C, Zemirli N, Portier A, Garcin D, Bidere N, Vazquez A, et al. MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC biology*. 2012;10:44.
69. Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, et al. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature*. 2002;417(6891):871-5.
70. Zhao KW, Sikriwal D, Dong X, Guo P, Sun X, Dong JT. Oestrogen causes degradation of KLF5 by inducing the E3 ubiquitin ligase EFP in ER-positive breast cancer cells. *The Biochemical journal*. 2011;437(2):323-33.
71. Goncalves A, Burckstummer T, Dixit E, Scheicher R, Gorna MW, Karayel E, et al. Functional dissection of the TBK1 molecular network. *PloS one*. 2011;6(9):e23971.
72. Wang L, Li S, Dorf ME. NEMO binds ubiquitinated TANK-binding kinase 1 (TBK1) to regulate innate immune responses to RNA viruses. *PloS one*. 2012;7(9):e43756.
73. Pilli M, Arko-Mensah J, Ponpuak M, Roberts E, Master S, Mandell MA, et al. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity*. 2012;37(2):223-34.
74. Weidberg H, Elazar Z. TBK1 mediates crosstalk between the innate immune response and autophagy. *Science signaling*. 2011;4(187):pe39.
75. Zhao W. Negative regulation of TBK1-mediated antiviral immunity. *FEBS letters*. 2013;587(6):542-8.
76. Clement JF, Meloche S, Servant MJ. The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. *Cell research*. 2008;18(9):889-99.
77. Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS. Synoviocyte innate immune responses: TANK-binding kinase-1 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2012;51(4):610-8.
78. Kishore N, Huynh QK, Mathialagan S, Hall T, Rouw S, Creely D, et al. IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2: comparative analysis of recombinant human IKK-i, TBK-1, and IKK-2. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(16):13840-7.
79. Soulat D, Burckstummer T, Westermayer S, Goncalves A, Bauch A, Stefanovic A, et al. The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. *The EMBO journal*. 2008;27(15):2135-46.

80. Helgason E, Phung QT, Dueber EC. Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: the emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. *FEBS letters*. 2013;587(8):1230-7.
81. Ma X, Helgason E, Phung QT, Quan CL, Iyer RS, Lee MW, et al. Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(24):9378-83.
82. Tu D, Zhu Z, Zhou AY, Yun CH, Lee KE, Toms AV, et al. Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1. *Cell reports*. 2013;3(3):747-58.
83. Miranda C, Roccato E, Raho G, Pagliardini S, Pierotti MA, Greco A. The TFG protein, involved in oncogenic rearrangements, interacts with TANK and NEMO, two proteins involved in the NF-kappaB pathway. *Journal of cellular physiology*. 2006;208(1):154-60.
84. Chariot A, Leonardi A, Muller J, Bonif M, Brown K, Siebenlist U. Association of the adaptor TANK with the I kappa B kinase (IKK) regulator NEMO connects IKK complexes with IKK epsilon and TBK1 kinases. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(40):37029-36.
85. Clark K, Peggie M, Plater L, Sorcek RJ, Young ER, Madwed JB, et al. Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity. *The Biochemical journal*. 2011;434(1):93-104.
86. Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, et al. The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nature immunology*. 2007;8(6):592-600.
87. Sharp TM, Crawford SE, Ajami NJ, Neill FH, Atmar RL, Katayama K, et al. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology journal*. 2012;9:181.
88. Sharp TM, Guix S, Katayama K, Crawford SE, Estes MK. Inhibition of cellular protein secretion by norwalk virus nonstructural protein p22 requires a mimic of an endoplasmic reticulum export signal. *PloS one*. 2010;5(10):e13130.
89. Sharp TM, Estes MK. An inside job: subversion of the host secretory pathway by intestinal pathogens. *Current opinion in infectious diseases*. 2010;23(5):464-9.
90. Beetz C, Johnson A, Schuh AL, Thakur S, Varga RE, Fothergill T, et al. Inhibition of TFG function causes hereditary axon degeneration by impairing endoplasmic reticulum structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(13):5091-6.

91. Yonekawa S, Furuno A, Baba T, Fujiki Y, Ogasawara Y, Yamamoto A, et al. Sec16B is involved in the endoplasmic reticulum export of the peroxisomal membrane biogenesis factor peroxin 16 (Pex16) in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(31):12746-51.
92. Agrawal G, Subramani S. Emerging role of the endoplasmic reticulum in peroxisome biogenesis. *Frontiers in physiology*. 2013;4:286.
93. Lynes EM, Simmen T. Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): how diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(10):1893-905.
94. Raturi A, Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(1):213-24.

## FIGURE LEGENDS:

### **Figure 1: TFG interacts and colocalizes specifically with TRAF3**

(A) HEK293 cells were stably transfected with pcDNA3-FLAG-TRAF3 or pcDNA3-FLAG alone. After G418 selection, cells were lysed and subjected to AP/MS as described here (30). Data for TFG, which was undetected in control experiments, represent previously unpublished information from two biological replicates. MS; mascot score, TP; average total number of peptides (spectral counts) identified, UP; number of unique peptides observed.

(B) HEK293T cells were transiently transfected with empty vector (-) or with vectors encoding FLAG-tagged TFG (FLAG-TFG) together with Myc-tagged TRAF3 (Myc-TRAF3). FLAG-tagged and Myc-tagged proteins were immunoprecipitated (IP) as indicated for analysis and whole cells extracts (WCE) were also analysed with anti-FLAG (M2) or anti-Myc (A-14) antibodies. Data represents representative results from at least 3 independent experiments.

(C) HEK293T cells were transfected with empty vector (-) or with vectors encoding Myc-tagged TFG (Myc-TFG) together with FLAG-tagged TRAF2, TRAF3 or TRAF6. Myc-TFG was immunoprecipitated and subjected to immunoblot analysis using anti-Myc (A-14) and anti-FLAG (M2) antibodies. Data represents representative results from at least three independent experiments.

(D) HeLa cells were transfected with both Myc-TFG and FLAG-TRAF3. Cells were stained with anti-Myc (9E10) and polyclonal anti-FLAG antibodies. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Images are representative of three independent experiments in which cells were examined and displayed similar staining.

### **Figure 2: TFG accumulates within ER-to-Golgi compartments**

(A) HeLa cells were immunostained for endogenous TFG along with different markers of the ER-to-Golgi associated compartments including Sec31A, ERGIC53, GM130

and EEA1. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Scaling bars represent identified length.

(B) HeLa cells were transfected with FLAG-TFG encoding plasmids and subsequently infected with SeV for 8h before being fixed, permeabilized, and immunostained with anti-FLAG (M2) or anti-Sec16A antibodies. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Scaling bars represent identified length. All images for all panels were representative of at least two independent experiments in which cells were examined and displayed similar staining.

**Figure 3: TFG is part of MAVS-TRAF3-TBK1 molecular complex upon activation of intracellular RNA sensors**

(A) HeLa cells were transfected with FLAG-TRAF3 encoding plasmids before being infected by SeV for 8h before being fixed, permeabilized and immunostained with anti-FLAG (M2) or anti-TFG antibodies. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Scaling bars represent identified length. All images for all panels were representative of at least two independent experiments in which cells were examined and displayed similar staining.

(B) WCE were prepared from HeLa cells subjected to SeV infection for indicated times and were then immunoprecipitated using antibodies directed against endogenous TFG or isotype control antibodies (IgG) before being immunoblotted for the presence of endogenous TRAF3 and TBK1. WCE were also immunoblotted. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of at least three independent experiments.

(C) WCE were prepared from HeLa cells subjected to SeV infection for indicated times and were then immunoprecipitated using antibodies directed against endogenous TRAF3 (anti-TRAF3 H-20) or isotype control antibodies (IgG) before being immunoblotted for the presence of endogenous MAVS and TBK1. WCE were also immunoblotted. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of three independent experiments.

(D) HeLa cells were either infected by SeV for 4h or transfected with Poly(I:C) for 4h before being fixed, permeabilized and immunostained with anti-MAVS or anti-TFG



antibodies. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Scaling bars represent identified length. White arrows represent sites of close proximity between MAVS and TFG. All images for all panels were representative of two independent experiments in which cells were examined and displayed similar staining.

**Figure 4: TFG is required for the formation of MAVS-TRAF3-TBK1 complex and for downstream signaling upon cytosolic RNA sensor activation.**

(A-B) Co-immunoprecipitation experiments were carried out from HEK293T WCE previously treated with indicated siRNA followed by SeV infection. Same WCE were also used in immunoblot analysis with indicated antibodies. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of two independent experiments.

(C) WCE from HeLa cells treated with indicated siRNA were used in immunoblot analysis with indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. Same WCE were used in native-page under non-denaturing conditions to evaluate IRF3 dimerization. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of three independent experiments.

(D) MRC-5 fibroblasts were infected with different lentiviral vectors encoding different TFG-targeting shRNA (shTFG #1, 2 or 3) or a nontargeting (NT) control shRNA (shNT) and then subjected to puromycin selection as described in Materials and Methods. Cells were then left uninfected or infected with SeV for the times indicated. WCE were harvested and used in immunoblot analysis with indicated antibodies.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of two independent experiments

### **Figure 5: TFG is required for optimal production of ISGs and type I IFN secretion upon viral infection**

(A) WCE from HeLa cells treated with indicated siRNA were used in immunoblot analysis with indicated antibodies. These results are representative of at least three independent experiments with similar results.

(B) HeLa cells previously treated with non-targeting siRNA (-) or siRNA targeting TFG (siTFG #1) were left uninfected or infected with SeV for 16h. Supernatants were collected postinfection and analyzed for IFN- $\beta$  by ELISA. Mean values and SEM of triplicates are shown (\*\*\*) P-value < 0,001).

### **Figure 6: Knockdown of TFG increases viral replication and dissemination**

(A) HeLa cells were treated with siNT or with four different siTFG constructs. Cells were then infected with VSV-GFP for 16h at a MOI of 0,1 and monolayers were analysed with an inverted fluorescence microscope. Observation from one experiment out of three experiments is shown.

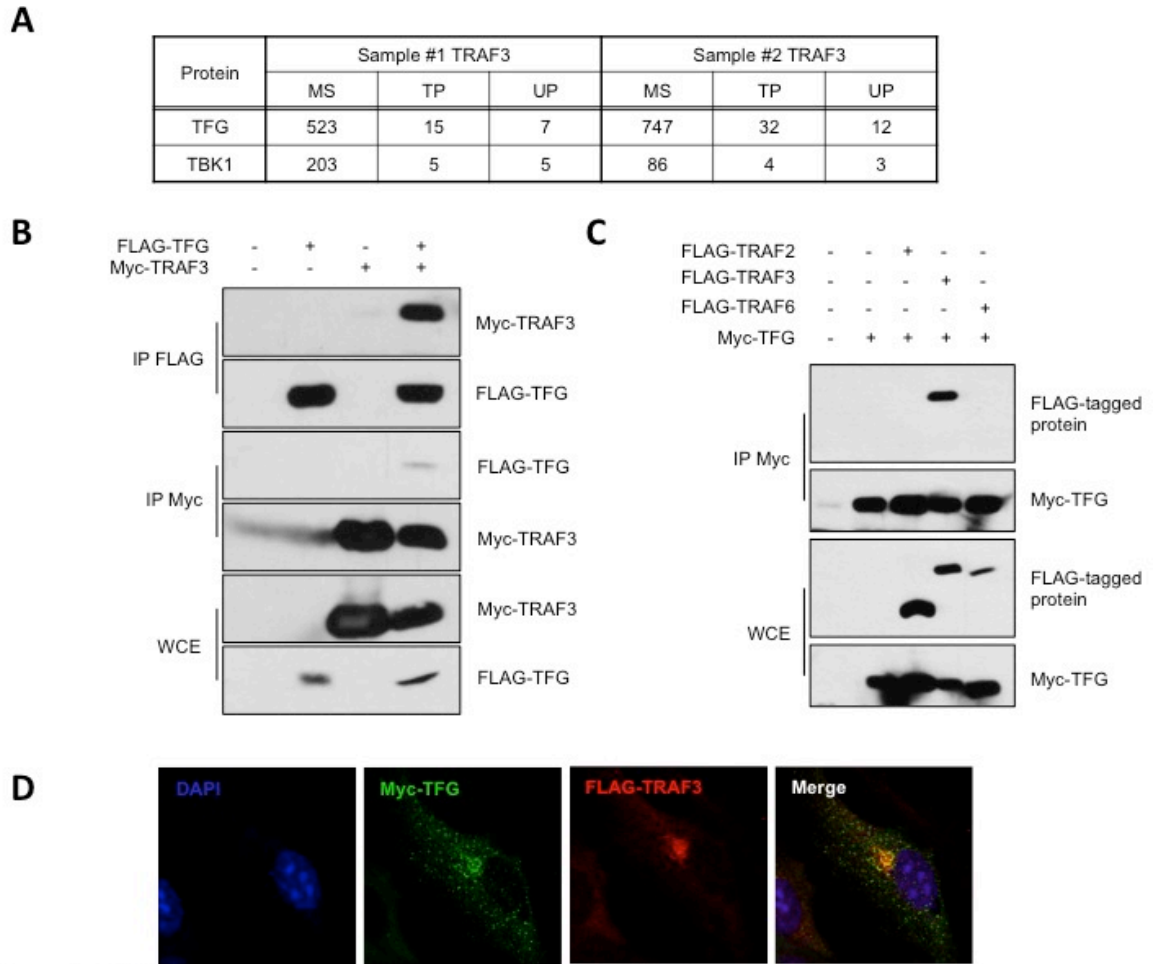
(B) HeLa cells were treated with siNT or with siTFG #1 before being infected with VSV-GFP for 16h at indicated MOI. Monolayers were analyzed by fluorescence microscopy before WCE were prepared. WCE were then immunoblotted with indicated antibodies either GFP, TFG or  $\beta$ -actin.

(C) MRC-5 fibroblasts were infected with different lentiviral vectors encoding different TFG-targeting shRNA (shTFG #1, 2 or 3) or a nontargeting (NT) control shRNA (shNT) and then subjected to puromycin selection. Cells were then infected with VSV-GFP for 16h at a MOI of 0,01. and monolayers were analysed with an inverted microscope. Then, the extent of VSV-GFP infection was further analysed by quantifying GFP-positive cells by flow cytometry. Data were pooled from three independent experiments and are expressed relatively to their cognate shNT control from each experiment to account day-to-day variation. Mean values and SEM of pooled data are shown (\*\*\*) P-value < 0,001). Raw data from a representative experiment are shown in the accompanying table. The number of events (# events)

represents the number of cells quantified in the selected population (sample) from which GFP-positive cells (GFP+) have been identified. The percentage of GFP-positive cells within the selected population is also shown.

**Figure 7: Proposed unified model representing the implication of TFG in the organization of RLR-dependent antiviral innate immunity**

The ER-to-Golgi vesicular transport system serves as an organizing membrane-rich platform allowing organization of RLR-dependent antiviral innate immunity. TFG is involved in vesicle COPII-coated vesicles biogenesis (pink circles) from the ERES to the ERGIC, a key sorting hub for secretory cargoes. TFG thereby enables efficient export of proteins from the ER to other organelles. As it was shown recently to self-associate to generate larger polymers (depicted here as an orange-like matrix), TFG also allows the proper positioning of essential effectors (TRAF3, NEMO, TANK, TBK1) with MAVS onto an interface between mitochondria and ER-related membranes where they can functionally interact upon viral infection. SER: smooth endoplasmic reticulum, RER: rough endoplasmic reticulum. Model was created using Servier Medical Art templates ([www.servier.com](http://www.servier.com)) licensed under a CC BY 3.0 license.



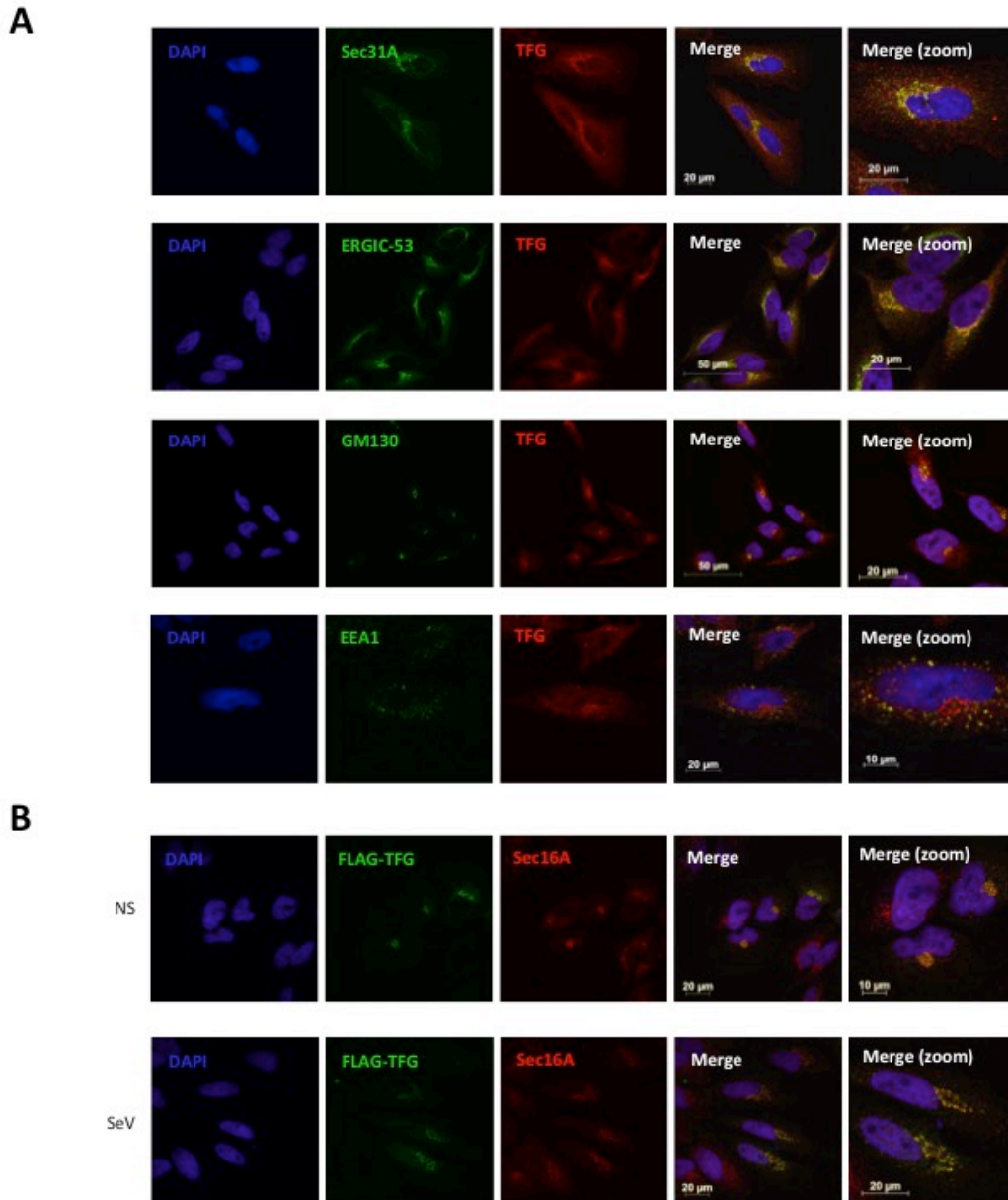
**Figure 1: TFG interacts and colocalizes specifically with TRAF3**

(A) HEK293 cells were stably transfected with pcDNA3-FLAG-TRAF3 or pcDNA3-FLAG alone. After G418 selection, cells were lysed and subjected to AP/MS as described here (30). Data for TFG, which was undetected in control experiments, represent previously unpublished information from two biological replicates. MS; mascot score, TP; average total number of peptides (spectral counts) identified, UP; number of unique peptides observed.

(B) HEK293T cells were transiently transfected with empty vector (-) or with vectors encoding FLAG-tagged TFG (FLAG-TFG) together with Myc-tagged TRAF3 (Myc-TRAF3). FLAG-tagged and Myc-tagged proteins were immunoprecipitated (IP) as indicated for analysis and whole cells extracts (WCE) were also analysed with anti-FLAG (M2) or anti-Myc (A-14) antibodies. Data represents representative results from at least 3 independent experiments.

(C) HEK293T cells were transfected with empty vector (-) or with vectors encoding Myc-tagged TFG (Myc-TFG) together with FLAG-tagged TRAF2, TRAF3 or TRAF6. Myc-TFG was immunoprecipitated and subjected to immunoblot analysis using anti-Myc (A-14) and anti-FLAG (M2) antibodies. Data represents representative results from at least three independent experiments.

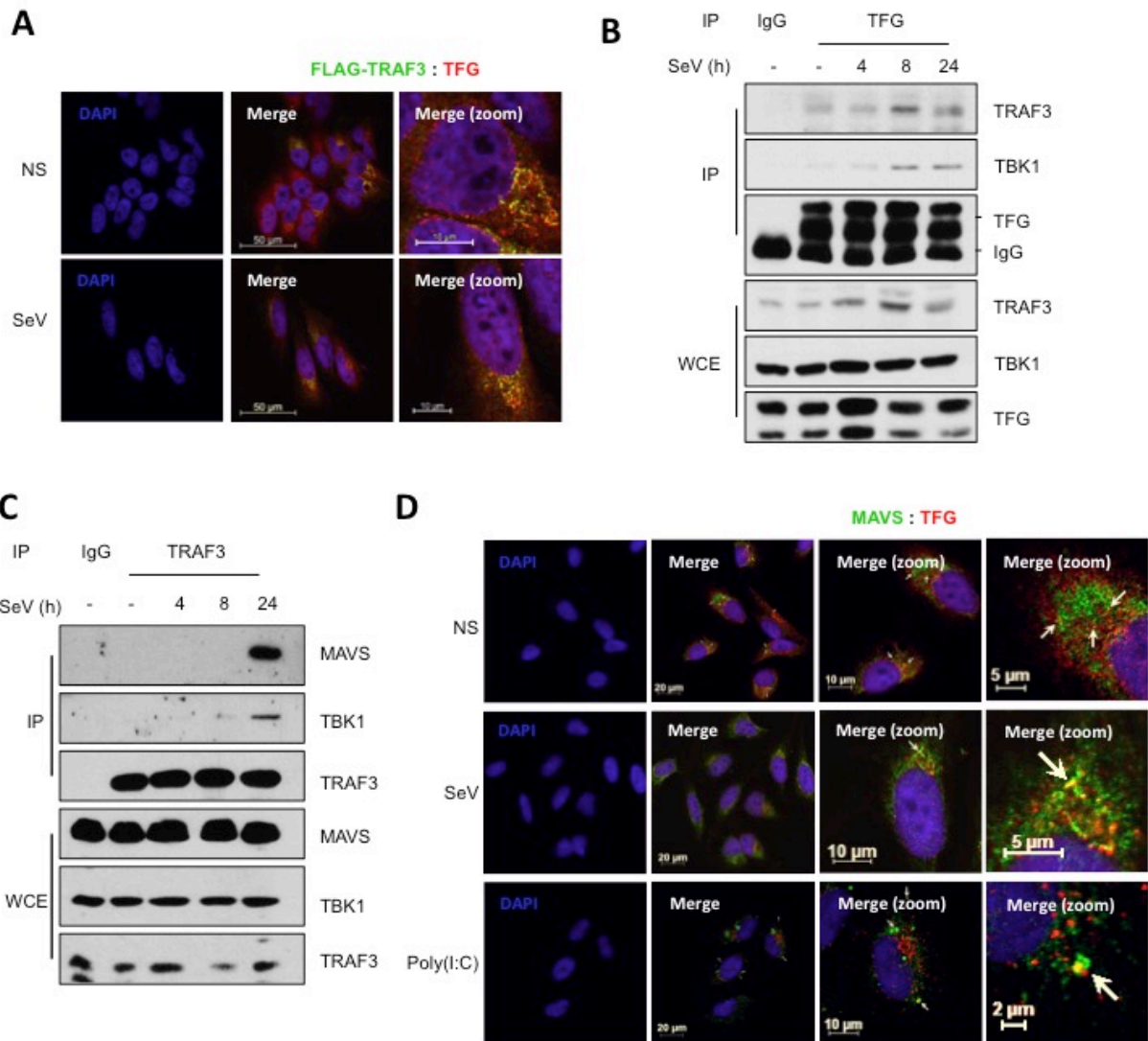
(D) HeLa cells were transfected with both Myc-TFG and FLAG-TRAF3. Cells were stained with anti-Myc (9E10) and polyclonal anti-FLAG antibodies. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Images are representative of three independent experiments in which cells were examined and displayed similar staining.



**Figure 2: TFG accumulates within ER-to-Golgi compartments**

(A) HeLa cells were immunostained for endogenous TFG along with different markers of the ER-to-Golgi associated compartments including Sec31A, ERGIC53, GM130 and EEA1. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Scaling bars represent identified length.

(B) HeLa cells were transfected with FLAG-TFG encoding plasmids and subsequently infected with SeV for 8h before being fixed, permeabilized, and immunostained with anti-FLAG (M2) or anti-Sec16A antibodies. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Scaling bars represent identified length. All images for all panels were representative of at least two independent experiments in which cells were examined and displayed similar staining.



**Figure 3: TFG is part of MAVS-TRAF3-TBK1 molecular complex upon activation of intracellular RNA sensors**

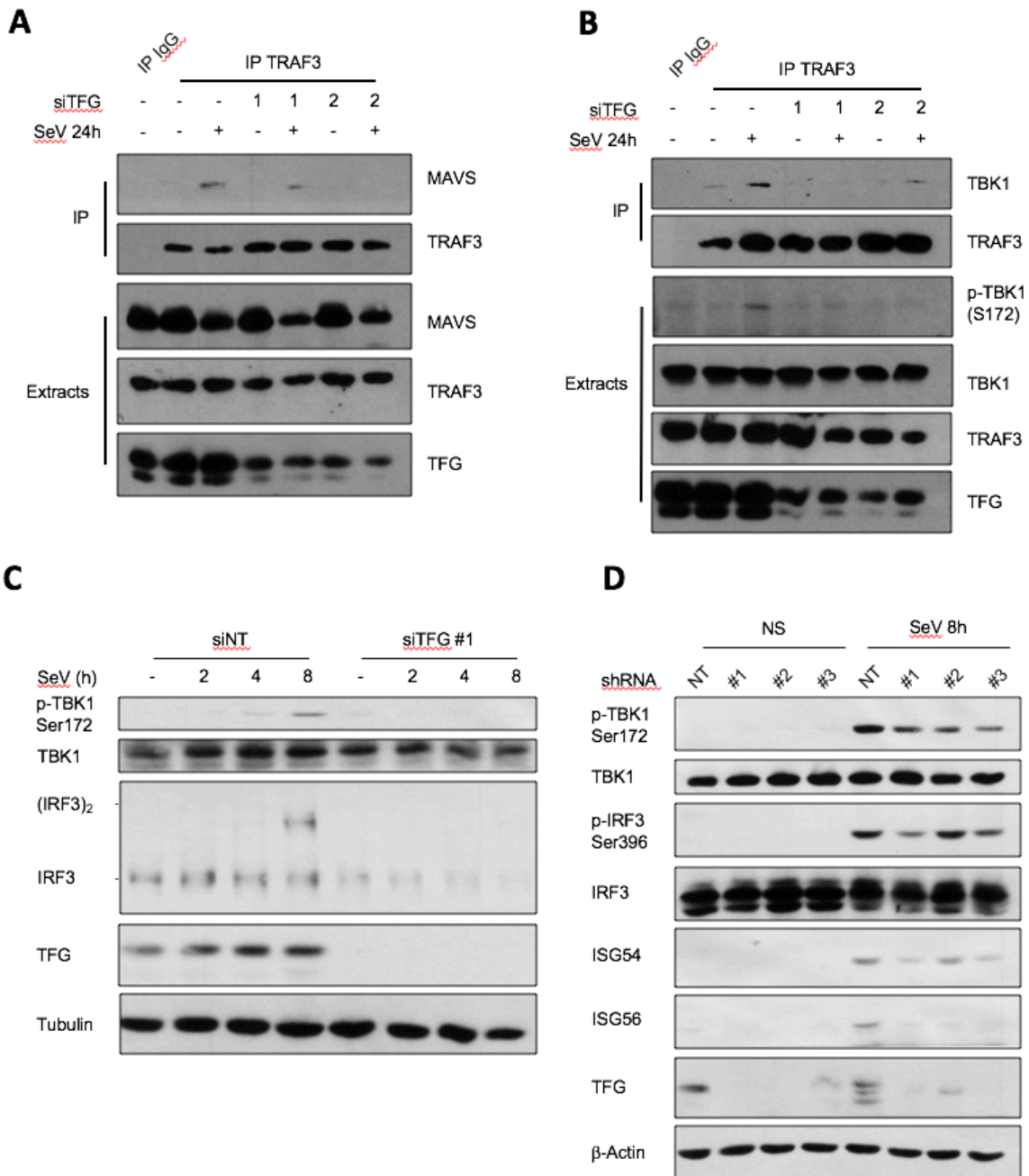
(A) HeLa cells were transfected with FLAG-TRAF3 encoding plasmids before being infected by SeV for 8h before being fixed, permeabilized and immunostained with anti-FLAG (M2) or anti-TFG antibodies. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Scaling bars represent identified length. All images for all panels were representative of at least two independent experiments in which cells were examined and displayed similar staining.

(B) WCE were prepared from HeLa cells subjected to SeV infection for indicated times and were then immunoprecipitated using antibodies directed against endogenous TFG or isotype control antibodies (IgG) before being immunoblotted for the presence of endogenous TRAF3 and TBK1. WCE were also immunoblotted. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of at least three independent experiments.

(C) WCE were prepared from HeLa cells subjected to SeV infection for indicated times and were then immunoprecipitated using antibodies directed against endogenous TRAF3 (anti-TRAF3 H-20) or isotype control antibodies (IgG) before being immunoblotted for the presence of endogenous MAVS and TBK1.

WCE were also immunoblotted. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of three independent experiments.

(D) HeLa cells were either infected by SeV for 4h or transfected with Poly(I:C) for 4h before being fixed, permeabilized and immunostained with anti-MAVS or anti-TFG antibodies. Nuclei were labeled with DAPI. Cells were then visualized by confocal microscopy. Scaling bars represent identified length. White arrows represent sites of close proximity between MAVS and TFG. All images for all panels were representative of two independent experiments in which cells were examined and displayed similar staining.



**Figure 4: TFG is required for the formation of MAVS-TRAF3-TBK1 complex and for downstream signaling upon cytosolic RNA sensor activation.**

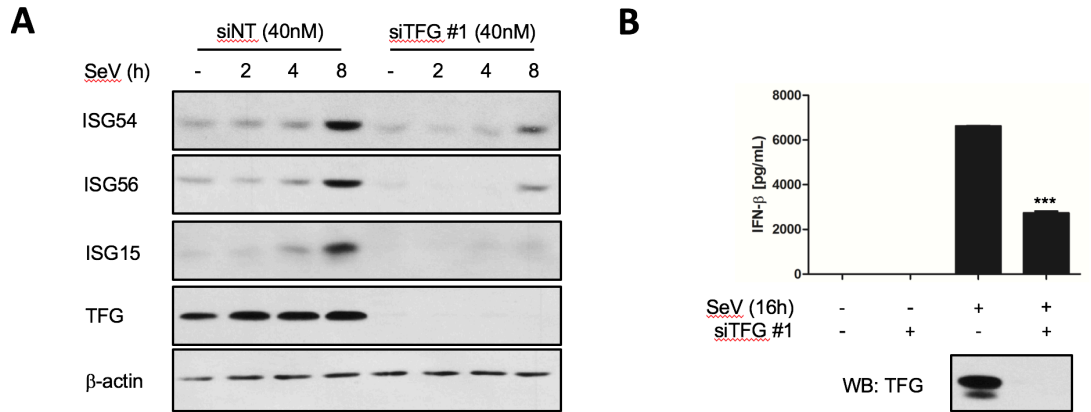
(A-B) Co-immunoprecipitation experiments were carried out from HEK293T WCE previously treated with indicated siRNA followed by SeV infection. Same WCE were also used in immunoblot analysis with indicated antibodies. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of two independent experiments.

(C) WCE from HeLa cells treated with indicated siRNA were used in immunoblot analysis with indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. Same WCE were used in native-page



under non-denaturing conditions to evaluate IRF3 dimerization. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of three independent experiments.

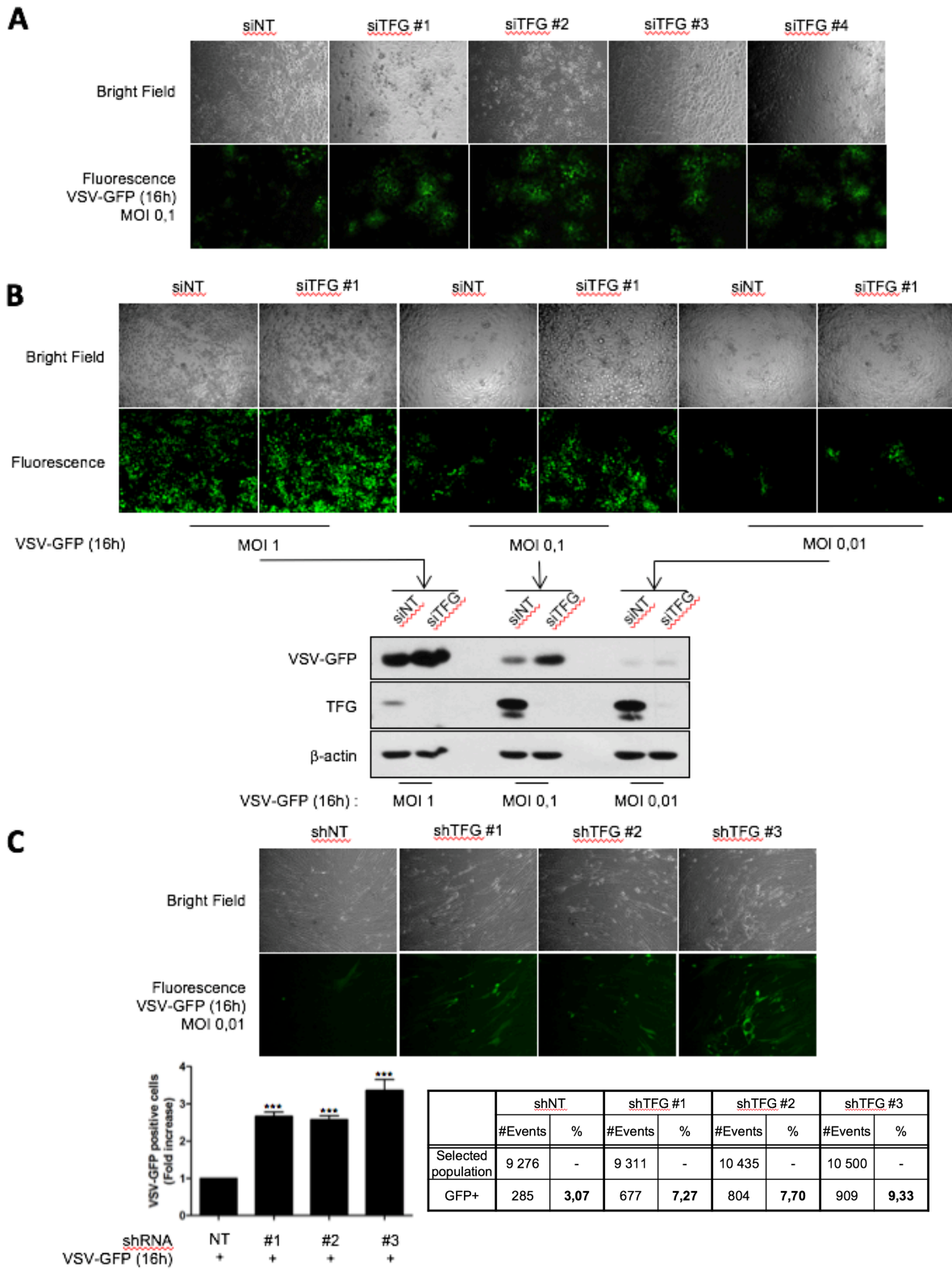
(D) MRC-5 fibroblasts were infected with different lentiviral vectors encoding different TFG-targeting shRNA (shTFG #1, 2 or 3) or a nontargeting (NT) control shRNA (shNT) and then subjected to puromycin selection as described in Materials and Methods. Cells were then left uninfected or infected with SeV for the times indicated. WCE were harvested and used in immunoblot analysis with indicated antibodies.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Immunoblots shown are from a single experiment and are representative of two independent experiments.



**Figure 5: TFG is required for optimal production of ISGs and type I IFN secretion upon viral infection**

(A) WCE from HeLa cells treated with indicated siRNA were used in immunoblot analysis with indicated antibodies. These results are representative of at least three independent experiments with similar results.

(B) HeLa cells previously treated with non-targeting siRNA (-) or siRNA targeting TFG (siTFG #1) were left uninfected or infected with SeV for 16h. Supernatants were collected postinfection and analyzed for IFN-β by ELISA. Mean values and SEM of triplicates are shown (\*\*\*) P-value < 0,001).

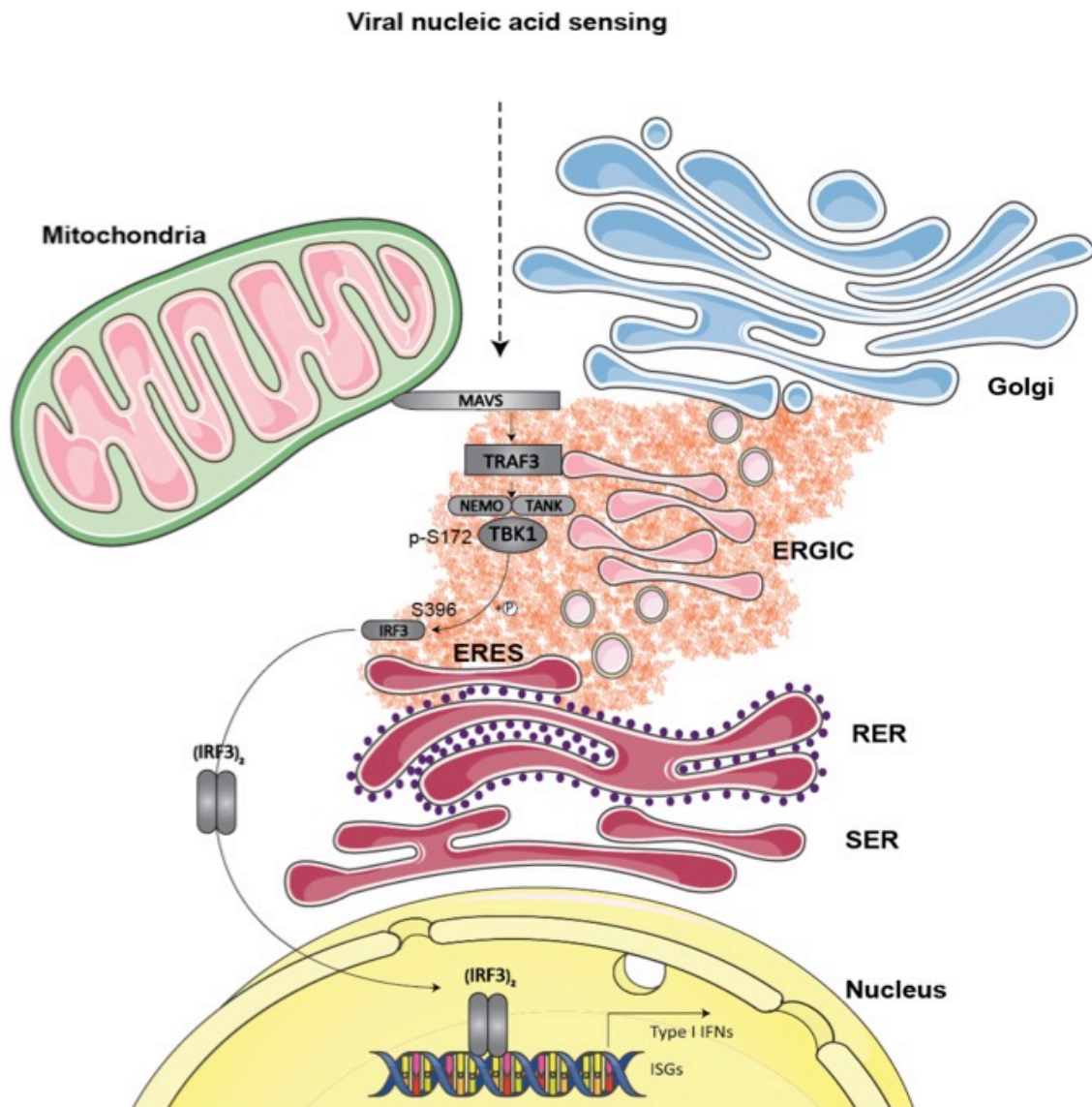


**Figure 6: Knockdown of TFG increases viral replication and dissemination**

(A) HeLa cells were treated with siNT or with four different siTFG constructs. Cells were then infected with VSV-GFP for 16h at a MOI of 0,1 and monolayers were analysed with an inverted fluorescence microscope. Observation from one experiment out of three experiments is shown.

(B) HeLa cells were treated with siNT or with siTFG #1 before being infected with VSV-GFP for 16h at indicated MOI. Monolayers were analyzed by fluorescence microscopy before WCE were prepared. WCE were then immunoblotted with indicated antibodies recognizing either GFP, TFG or  $\beta$ -actin.

(C) MRC-5 fibroblasts were infected with different lentiviral vectors encoding different TFG-targeting shRNA (shTFG #1, 2 or 3) or a nontargeting (NT) control shRNA (shNT) and then subjected to puromycin selection. Cells were then infected with VSV-GFP for 16h at a MOI of 0,01. and monolayers were analysed with an inverted microscope. Then, the extent of VSV-GFP infection was further analysed by quantifying GFP-positive cells by flow cytometry. Data were pooled from three independent experiments and are expressed relatively to their cognate shNT control from each experiment to account day-to-day variation. Mean values and SEM of pooled data are shown (\*\*\*) P-value < 0,001). Raw data from a representative experiment are shown in the accompanying table. The number of events (# events) represents the number of cells quantified in the selected population (sample) from which GFP-positive cells (GFP+) have been identified. The percentage of GFP-positive cells within the selected population is also shown.



**Figure 7: Proposed unified model representing the implication of TFG in the organization of RLR-dependent antiviral innate immunity**

The ER-to-Golgi vesicular transport system serves as an organizing membrane-rich platform allowing organization of RLR-dependent antiviral innate immunity. TFG is involved in vesicle COPII-coated vesicles biogenesis (pink circles) from the ERES to the ERGIC, a key sorting hub for secretory cargoes. TFG thereby enables efficient export of proteins from the ER to other organelles. As it was shown recently to self-associate to generate larger polymers (depicted here as an orange-like matrix), TFG also allows the proper positioning of essential effectors (TRAF3, NEMO, TANK, TBK1) with MAVS onto an interface between mitochondria and ER-related membranes where they can functionally interact upon viral infection. SER: smooth endoplasmic reticulum, RER: rough endoplasmic reticulum. Model was created using Servier Medical Art templates ([www.servier.com](http://www.servier.com)) licensed under a CC BY 3.0 license.

## **3.2 TFG – DE L’OPTIMISATION DE LA TRANSCRIPTION À LA RÉGULATION DE LA TRADUCTION DES ISGs**

La réplication efficace des virus requiert leurs capacités intrinsèques particulières leur permettant de prendre contrôle des voies de signalisation de l’hôte afin de favoriser la synthèse macromoléculaire, la croissance et la survie cellulaire. En tant que parasite intracellulaire obligatoire, ils dépendent d’ailleurs de leur aptitude à recruter les ribosomes cellulaires afin de traduire leur ARNm viral et produire les protéines nécessaires à leur réplication (396). En effet, malgré leur complexité, les virus sont dépourvus de mécanismes de traduction et dépendent par le fait même de la machinerie cellulaire endogène. Ce faisant, tel que décrit précédemment, une des actions antivirales des IFNs de type I est la suppression globale de la traduction protéique cellulaire. Cet effet provient entre autres de la production de certains ISGs, tels qu’ISG56 et PKR, qui limitent la traduction de la majorité des ARNm cellulaires et viraux (135, 396). Toutefois, de manière à exprimer pleinement la réponse antivirale, l’expression et la traduction des effecteurs de la défense de l’hôte, tels que les cytokines et les ISGs, doivent être maintenues. À cet effet, dans certains types cellulaires, une infection virale mène à l’activation de la voie de signalisation impliquant mTOR, une voie qui promeut la traduction, la croissance et la survie cellulaire.

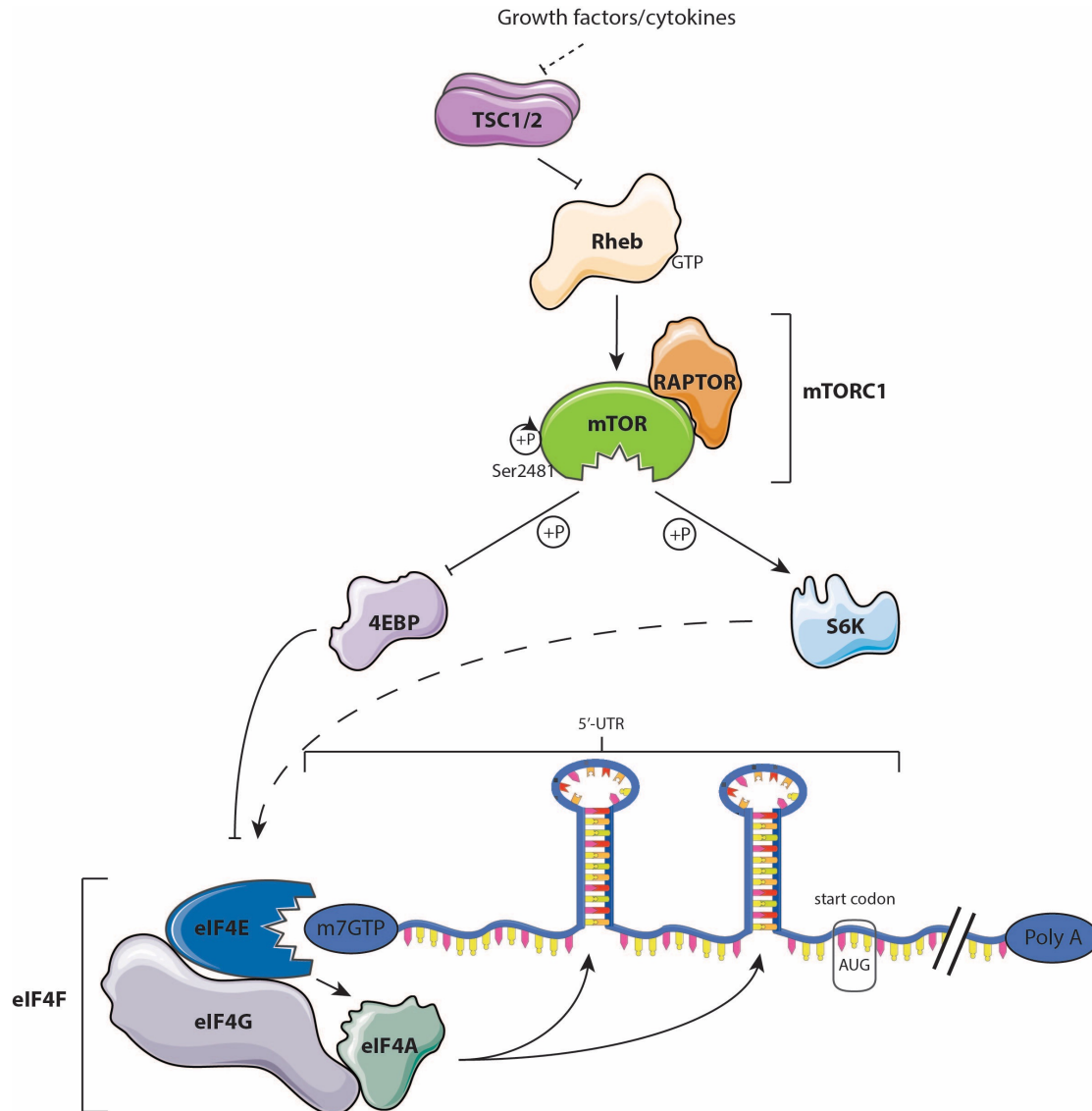
### **3.2.1 LA RÉGULATION ET LES EFFETS MOLÉCULAIRES DE mTOR**

Étant donné ses effets multiples sur la survie cellulaire, mTOR est une protéine hautement régulée, et intègre ainsi de nombreux signaux en amont qui influence son activité. mTOR réside en fait dans deux types de complexes nommés, mTOR complex 1 (mTORC1) et mTORC2, comprenant les partenaires de régulation Raptor et Rictor, respectivement (397). mTORC1, le mieux caractérisé, dépend de différents stimuli (c.-à-d. cytokines, hormones de croissance) afin d’être activé entre autres par la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Akt. Plus précisément, ces stimuli mènent à la phosphorylation et à la suppression de l’effet inhibiteur des *tuberous sclerosis complex* (TSC)1 et TSC2. TSC1/2 représentent en fait des

régulateurs négatifs clés des fonctions de mTORC1 et agissent en tant que GAP qui neutralise la protéine Rheb, une protéine liant le GTP, en favorisant sa conversion vers sa forme inactive liée au GDP. Lorsque lié au GTP, Rheb favorise l'activité de mTORC1. De manière intéressante, Rheb se situe au niveau de compartiments cellulaires riches en membranes tels que l'appareil de Golgi, l'ER, les lysosomes et les mitochondries; mTORC1 doit ainsi être en mesure de se mobiliser vers ces régions cellulaires afin d'être activé. En plus de ces événements menant au bon positionnement de mTORC1 auprès de ses compartiments d'activation, l'activité phosphotransférase de mTOR a été démontrée comme étant aussi régulée par certaines modifications post-traductionnelles, incluant sa phosphorylation et son autophosphorylation. Notamment, parmi les sites de phosphorylation de mTOR caractérisés (c.-à-d. Ser2448, Ser2481, Thr2446, Ser1261, Ser2159, Thr2164), celui de la Ser2159, qui se trouve au niveau du domaine kinase de mTOR, a récemment été démontré comme ayant la capacité de promouvoir la signalisation de mTORC1 (398). Mécanistiquement, ce site phosphoaccepteur modulerait l'interaction de mTOR avec les autres constituants du complexe mTORC1 (p. ex. Raptor) ce qui mènerait à l'augmentation de son autophosphorylation en Ser2481 et ainsi, à l'accroissement de son activité phosphotransférase auprès de ses différents substrats (398). La kinase catalysant cette phosphorylation en Ser2159 demeure toutefois inconnue.

Lorsqu'activé, mTORC1 phosphoryle les *p70 S6 kinases* (p70S6K)1 en Thr389 et p70S6K2, de même que l'*eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein* (4EBP)1, 4EBP2 et 4EBP3 de manière à accroître la traduction protéique et la croissance cellulaire. Suivant leur phosphorylation activatrice, les p70S6Ks stimulent la traduction grâce à la phosphorylation de différentes cibles incluant la protéine ribosomale S6 (rpS6), menant à la biogenèse de ribosomes ce qui augmente la capacité globale de biosynthèse protéique de la cellule. De plus, la phosphorylation inhibitrice des 4EBPs par mTORC1 favorise la traduction coiffe dépendante en facilitant la formation du complexe eIF4F (chapitre 3, figure 8). Ce complexe est formé de la sous-unité eIF4E liant la coiffe, de la protéine structurante eIF4G et de l'hélicase eIF4A (chapitre 3, figure 8). Ainsi, en phosphorylant les 4EBPs, mTORC1 prévient la séquestration de eIF4E par ces dernières, permettant eIF4E de s'associer

avec eIF4G (399). Alors qu'eIF4E est requis pour la traduction coiffe dépendante, ce facteur est particulièrement important pour la traduction des ARNm comportant une longue et complexe région non traduite en 5' (5'UTR; *5'untranslated region*), tels qu'IRF7 (399, 400). De manière intéressante, l'importance d'IRF7 dans la réponse antivirale suggère ainsi un rôle supplémentaire de mTOR au niveau de l'immunité innée.



**Figure 8 : Régulation et rôle de mTORC1 dans le contrôle de la traduction des ARNm.**

La signalisation amorcée par de nombreux facteurs de croissance et par une multitude de cytokines mène à la phosphorylation inhibitrice des complexes TSC1/2, qui suppriment normalement l'activation de Rheb, afin de stimuler l'activation de mTORC1. Suivant son autophosphorylation en Ser2481, mTOR régule ensuite ses effecteurs en aval, 4EBPs et p70S6Ks. À travers la phosphorylation des



4EBPs, mTOR libère eIF4E de l'inhibition induite par 4EBP favorisant ainsi la formation du complexe d'initiation eIF4F, formé d'eIF4E, d'eIF4G et d'eIF4A. eIF4E lie en fait la coiffe 5'm<sup>7</sup>GTP et augmente l'activité hélicase d'eIF4A. Ceci permet le déroulement des structures secondaires du 5'UTR des ARNm afin de faciliter la liaison de la petite sous-unité ribosomale et la traduction subséquente. Similairement, en activant les p70S6Ks, mTOR favorise indirectement l'activité hélicase d'eIF4A et la biogenèse des ribosomes à travers la régulation des substrats des S6Ks. Les flèches pointillées représentent la régulation indirecte d'un processus à travers d'autres joueurs non illustrés. Le modèle a été créé en utilisant les gabarits de *Servier Medical Art* sous une licence non restrictive CCBY 3.0 (<https://smart.servier.com/>).

### 3.2.1.1 mTOR et l'immunité innée

Le rôle initial de mTOR dans l'immunité innée a d'abord été identifié suivant la caractérisation de l'importance de la voie de signalisation PI3K/mTOR dans les effets dépendants des IFNs (129, 401-407). Ce faisant, l'activation de la voie PI3K/mTOR s'est imposée en tant qu'étape essentielle au plein développement des effets antiviraux des IFNs, notamment au niveau de l'induction de la traduction des ISGs (404, 405). Tel que ci-haut mentionné, mTOR a de nombreux effecteurs en aval qui possèdent de multiples effets au niveau de la régulation de la traduction des ARNm et de la synthèse protéique. Le répresseur de la traduction 4EBP1 en est un ayant un rôle clé dans la signalisation et la production des ISGs initiées par les IFNs (404). En effet, les IFNs de type I et de type II induisent la phosphorylation de 4EBP1 par mTORC1 réprimant ainsi ses propriétés limitant la traduction d'ARNm (403, 404, 408). Similairement, dans les MEFs 4EBP1<sup>-/-</sup>, l'induction des ISGs en réponse à une stimulation par les IFNs est augmentée comparativement aux MEFs sauvages (404). Cet effet induit par les IFNs confère une protection accrue contre les infections virales *in vivo*. En effet, les souris 4EBP1<sup>-/-</sup> sont plus résistantes aux conséquences induites par une infection au virus coxsackie B3 (409). Aussi, GSK-3β, dont l'activité faciliterait la liaison d'IRF3 à son élément de réponse (voir article en annexe) (410), détient aussi la capacité de phosphoryler 4EBP1 de manière à activer la synthèse des protéines. Ceci suggère ainsi un lien supplémentaire entre 4EBP1 et la réponse antivirale (411, 412). D'autre part, l'activation des p70S6Ks par mTOR participe aussi à l'instauration d'un plein état antiviral. En effet, les p70S6Ks (p70S6K1 en particulier), possèdent de nombreux substrats, incluant eIF4B et *programmed cell death 4 protein* (PDCD4), possédant des rôles distincts, mais convergeant en la

traduction optimale des ARNm (413). eIF4B est un régulateur positif de l'activité hélicase d'eIF4A. Ensemble, ces protéines déroulent les structures secondaires complexes au niveau du 5'UTR de certains ARNm afin de permettre à la sous-unité ribosomale 40S de repérer le codon d'initiation de la traduction (414-416). Il a été démontré que dans certains types cellulaires et en réponse aux IFNs de type I et de type II, p70S6K phosphoryle eIF4B de manière à promouvoir son activité. La signalisation médiée par mTOR régulant l'activité de p70S6K et de eIF4B semble d'ailleurs nécessaire à la traduction de certains ISGs (417). De plus, l'importance d'eIF4B dans la réponse aux IFNs est appuyée par la diminution de l'expression des ISGs suivant la diminution de l'expression d'eIF4B par siRNA (417). Un autre régulateur de l'activité hélicase d'eIF4A est la protéine PDCD4. PDCD4 est un partenaire d'eIF4A et séquestre ce facteur de traduction en compétitionnant avec eIF4G de manière à inhiber la traduction (418, 419). En phosphorylant PDCD4, p70S6K1 induit le recrutement du complexe ubiquitine ligase SCF  $\beta$ -TRCP et provoque la dégradation subséquente de PDCD4 afin de stimuler la traduction et la croissance cellulaire (413). En réponse aux IFNs, la dégradation de PDCD4, à travers sa phosphorylation par p70S6K1, entraîne ainsi une augmentation de la production des ISGs, incluant ISG15 (420). Ainsi, tel que présenté, l'activation des récepteurs aux IFNs met la signalisation en amont de mTOR de manière à amplifier la réponse antivirale tardive en stimulant la traduction de l'ARNm des ISGs. D'un autre côté, plusieurs nouvelles études attribuent plutôt à mTOR un rôle au niveau de la réponse antivirale précoce indépendante des IFNs.

En regard de la réponse innée antivirale précoce, mTORC1 a récemment été identifié en tant que complexe protéique dont l'activité était importante pour la production même des IFNs de type I dans les pDCs (209, 421). En fait, suivant la stimulation des TLR7/9, mTOR et ses effecteurs p70S6K1 et p70S6K2 agissent de manière à favoriser le couplage entre TLR9 et l'adaptateur MyD88 menant subséquentement à l'activation d'IRF7 (209, 421). Similairement, la voie mTOR semble importante dans la régulation de la production de cytokines suivant l'activation de TLR3 dans les kératinocytes (422). Au niveau des RLRs, l'absence des répresseurs traductionnels 4EBPs dans les MEFs et dans les souris mène à une

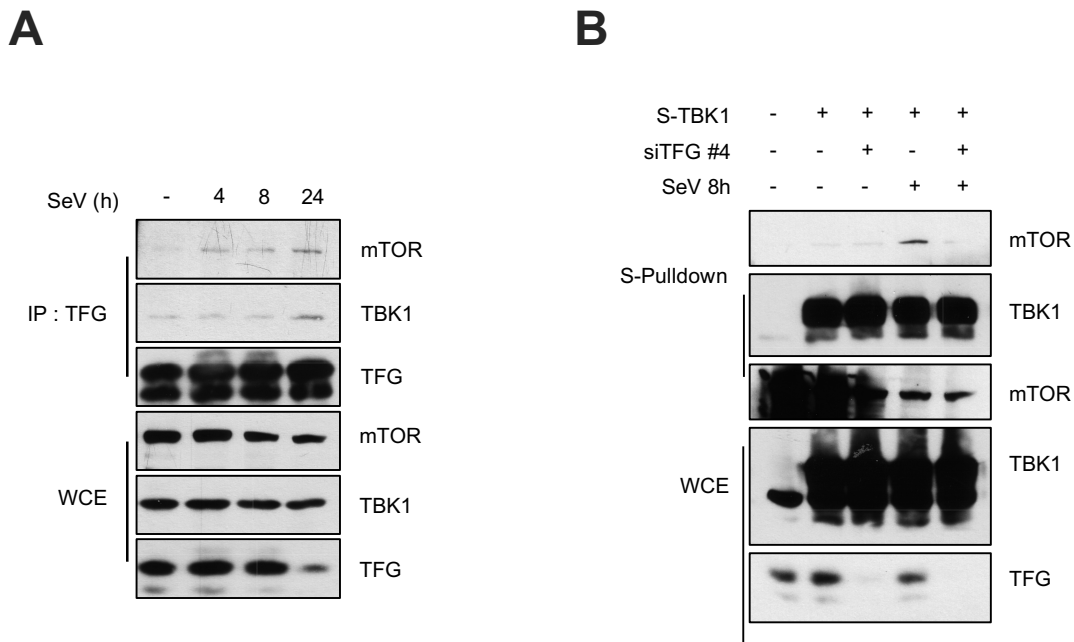
suppression de la réplication du VSV et du IAV grâce à une production accrue d'IFNs de type I (400). Ce dernier effet semble provenir de la traduction accrue des ARNm du facteur de transcription IRF7, et ce, de manière dépendante du facteur d'initiation eIF4E, membre du complexe d'initiation eIF4F (423). Malgré ces observations, les mécanismes moléculaires menant à la stimulation de la voie impliquant mTOR suivant l'activation des PRRs restent grandement indéfinies.

Au demeurant, mTOR semble être une protéine centrale dans la réponse antivirale dont l'activation auprès de Rheb qui se situe entre autres au niveau des régions riches en membranes du ER et de l'appareil de Golgi permet de stimuler l'activation de ses effecteurs en aval de manière à stimuler la production d'ISGs et de mener à une réponse antivirale adéquate. De manière intéressante, TFG est une protéine dont la localisation sous-cellulaire au niveau du ER et de ses compartiments environnants permet de concentrer les vésicules de transport à l'interface du ER/ERGIC. Tel que présenté, en établissant un tel lien entre les membranes du ER et ERGIC, TFG serait en mesure d'agir en tant que protéine unificatrice liant TRAF3 à son régulateur en amont, MAVS. Subséquemment, TFG pourrait alors permettre à TRAF3 de recruter TBK1 afin de créer un complexe macromoléculaire à travers lequel TRAF3 active TBK1. De manière intéressante, une étude récente a proposé un rapprochement entre les voies de signalisation des RLRs et de mTOR. De fait, la caractérisation du phosphoprotéome de cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 suivant une infection au SeV a permis d'identifier mTOR en tant que protéine phosphorylée suivant une telle infection (424). D'autre part, dans un modèle cellulaire de cancer de la prostate (PC3), des essais de co-immunoprécipitations ont démontré que mTOR, Raptor et NEMO se retrouvent dans le même réseau protéique (425). Étant donné le rôle avéré de TFG dans l'organisation de la réponse transcriptionnelle antivirale suivant une infection au SeV et que TFG a aussi la capacité de lier NEMO, l'identification du rôle potentiel de TFG dans le rapprochement fonctionnel entre les voies de signalisation des RLRs et de mTOR a été poursuivie (350).

## **3.2.2 TFG ET LE CONTRÔLE DE LA VOIE MTOR DANS LA RÉPONSE ANTIVIRALE INNÉE**

### **3.2.2.1 TFG permet le rapprochement entre mTOR et TBK1**

Tout d'abord, afin de déterminer la possibilité que mTOR soit présent au niveau du même complexe macromoléculaire que TFG et TBK1 et afin de vérifier si cette interaction potentielle est modulée lors d'une infection, un essai préliminaire d'immunoprécipitation a été accompli. De manière intéressante, suivant l'infection de cellules HeLa par le SeV, TBK1 et mTOR se retrouvent dans les mêmes immunocomplexes que TFG, et ce, dans une cinétique comparable. (chapitre 3, figure 9A). De manière à vérifier si une telle interaction nécessitait l'expression de TFG, un essai *pull-down* a été réalisé en faisant intervenir la protéine S-TBK1, le résultat d'une fusion entre TBK1 sauvage et le peptide S. Confirmant l'essai d'immunoprécipitation, mTOR est recruté à TBK1 suivant une infection virale. Notamment, ce recrutement requiert l'expression de TFG (chapitre 3, figure 9B). Une telle interaction entre TBK1 et mTOR suivant une infection virale admet par conséquent la possibilité d'une interrelation fonctionnelle entre la voie des RLRs et celle impliquant mTOR.



**Figure 9 : Le positionnement de TBK1 auprès de mTOR suivant une infection virale requiert l'expression de TFG.**

(A) Un essai de co-immunoprécipitation a été effectué à partir des extraits cellulaires de cellules HEK293T ayant été infectées préalablement par le SeV pour les temps indiqués. Les mêmes extraits ont ensuite été utilisés pour confirmer l'expression des protéines par immunobuvardage. Les résultats montrés proviennent de la même et unique expérimentation.

(B) Un essai *pull-down* a été effectué à partir d'extraits cellulaires de cellules HeLa ayant été préalablement traitées par 40 nM de siRNA contre TFG, puis infecté par le SeV pendant 8h. Les mêmes extraits ont été utilisés pour leur analyse par immunobuvardage. Les résultats montrés proviennent de la même et unique expérimentation.

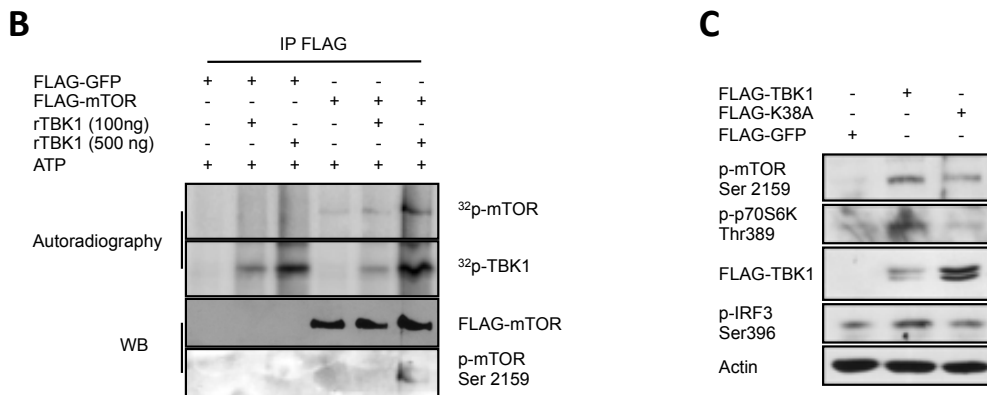
### 3.2.2.2 TFG permet la phosphorylation de mTOR en Ser2159 par TBK1

TBK1 est une kinase dont les substrats varient grandement. Outre IRF3 et IRF7, TBK1 est en mesure de phosphoryler l'optineurine (OPT), DDX3 et  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . Globalement, malgré les rôles distincts de chacun de ces substrats, tous partagent un site consensuel de phosphorylation reconnu par TBK1. L'alignement des séquences du site de phosphorylation de TBK1 de ses différents substrats révèle manifestement un site consensus composé d'une sérine centrale bordée par un acide aminé hydrophobe (Leu/Phe/Met) en position +1, et par un acide aminé non-chargé (Ser/Thr) en position -4 (chapitre 3, figure 10A). Notamment, la séquence entourant la Ser2159 de mTOR, dont la phosphorylation promeut la signalisation de mTORC1 vers ses substrats p70S6K1 et 4EBP1, concorde parfaitement avec un tel site

consensus (chapitre 3, figure 10A) (398). Certains résultats préliminaires confirment d'ailleurs que mTOR est un nouveau substrat de TBK1. En effet, en observant les résultats de l'essai kinase, il est possible de remarquer que FLAG-mTOR est bel et bien phosphorylé par différentes quantités de TBK1 recombinants (chapitre 3, figure 10B). De surcroît, la phosphorylation de mTOR obtenue correspond du moins partiellement à la phosphorylation de mTOR sur sa Ser2159 (p-mTOR Ser2159) (chapitre 3, figure 10B). De plus, l'expression ectopique transitoire de FLAG-TBK1 dans les cellules HEK293T induit la phosphorylation de mTOR endogène en Ser2159, et, *ipso facto*, celle de son effecteur, p70S6K1 (Thr389) (chapitre 3, figure 10C). En contrepartie, l'expression ectopique d'un mutant inactif de TBK1 (FLAG-TBK1-K38A) n'affecte que marginalement l'activation de mTOR et de p70S6K1 (chapitre 3, figure 10C). En somme, ces résultats démontrent la capacité potentielle de TBK1 à phosphoryler mTOR dans un contexte extracellulaire ou dans une situation de surexpression.

**A**

a.a. position	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6
IRF3 Ser402	S	N	S	H	P	L	pS	L	T	S	D	Q	Y
IRF7 Ser479	L	D	S	S	S	L	pS	L	C	L	S	S	A
OPT Ser177	S	G	S	S	E	D	pS	F	V	E	I	R	M
DDX3 Ser442	N	A	T	G	K	D	pS	L	T	L	V	F	V
IκBα Ser36	H	D	S	G	L	D	pS	M	K	D	E	E	Y
TBK1 Ser172	D	D	E	Q	F	V	pS	L	Y	G	T	E	E
<b>TBK1 consensus:</b>	X	X	S/T/E	X	X	X	pS	L/F/M	X	X	X	X	X
mTOR Ser2159	I	Q	S	I	A	P	pS	L	Q	V	I	T	S



**Figure 10 : TBK1 cible la sérine 2159 de mTOR.**

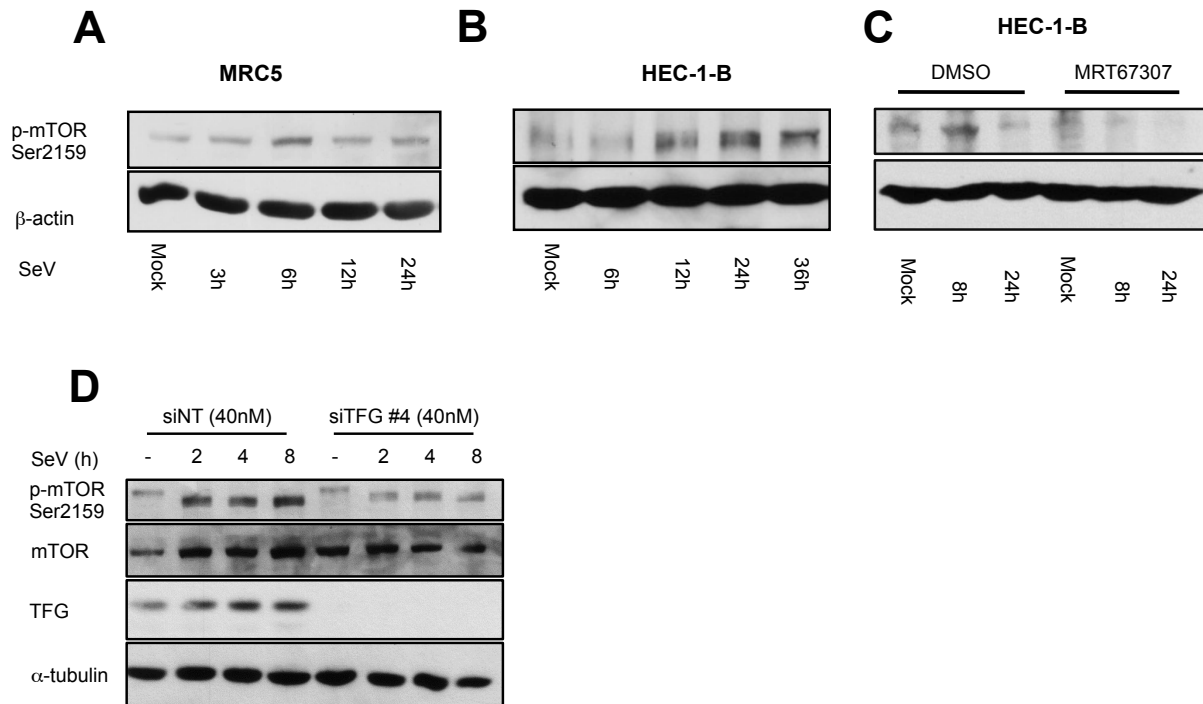
(A) Alignement de séquences de plusieurs substrats connus de TBK1 démontrant un site consensus de phosphorylation partagé par mTOR au niveau de Ser2159.

(B) Phosphorylation *in vitro* de mTOR par la kinase TBK1 recombinante. Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le contrôle FLAG-GFP ou FLAG-mTOR tel qu'indiqué. 48 heures post-transfection, FLAG-mTOR et FLAG-GFP ont été immunopurifiés et utilisés en tant que substrats des 100 ng ou 500 ng de TBK1 recombinants lors d'un essai kinase *in vitro* faisant intervenir de l'ATP radioactive ( $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP) pour l'autoradiographie ou de l'ATP non radioactive pour l'analyse par *western blot* (WB). N = 1

(C) L'expression ectopique transitoire de TBK1 induit la phosphorylation de mTOR sur sa Ser2159. Les cellules HEK293T ont été transfectées par les plasmides exprimant les protéines inscrites. 48 heures post-transfection, les extraits cellulaires ont été préparés et analysés par immunobuvardage. FLAG-K38A correspond à la forme inactive de la kinase TBK1. N = 1

De manière à mieux étoffer l'influence d'une infection virale sur le degré de phosphorylation de mTOR par TBK1, différentes expérimentations préliminaires ont été accomplies. Suivant une infection virale au SeV dans les MRC5, une augmentation de la phosphorylation de mTOR en Ser2159 peut être observée, suggérant ainsi une modulation de l'activité de mTOR par TBK1 (chapitre 3, figure 11A). D'un autre côté, les IFNs de type I et de type II ont aussi la capacité d'activer la voie PI3K/mTOR en engageant leurs voies de signalisation suivant l'activation de leurs récepteurs respectifs (426, 427). Ainsi, afin d'exclure l'apport d'une telle signalisation, la phosphorylation de mTOR en Ser2159 suivant une infection virale a été mesurée dans la lignée cellulaire HEC1B, une lignée cellulaire incapable de répondre aux interférons de type I et de type II (428). À l'instar de la lignée cellulaire MRC5, une augmentation de la phosphorylation de mTOR (Ser2159) est observée suivant une infection au SeV démontrant ainsi que cette modification post-traductionnelle se déroule précocement dans la signalisation des RLRs (chapitre 3, figure 11B). TBK1 semble par ailleurs être la kinase responsable de cette phosphorylation, puisque le prétraitement des cellules HEC1B par l'inhibiteur sélectif de TBK1, le MRT67307, contrecarre la phosphorylation de mTOR normalement induite par une infection au SeV (chapitre 3, figure 11C). En outre, étant donné que TFG est nécessaire au rapprochement entre mTOR et TBK1 (chapitre 3, figure 9B), la diminution de son expression devrait aussi limiter l'activation de mTOR. Conformément à cette hypothèse, l'induction de la phosphorylation de mTOR en Ser2159 suivant une infection au SeV est grandement diminuée lorsque l'expression de TFG est réduite par siRNA (chapitre 3, figure 11D).





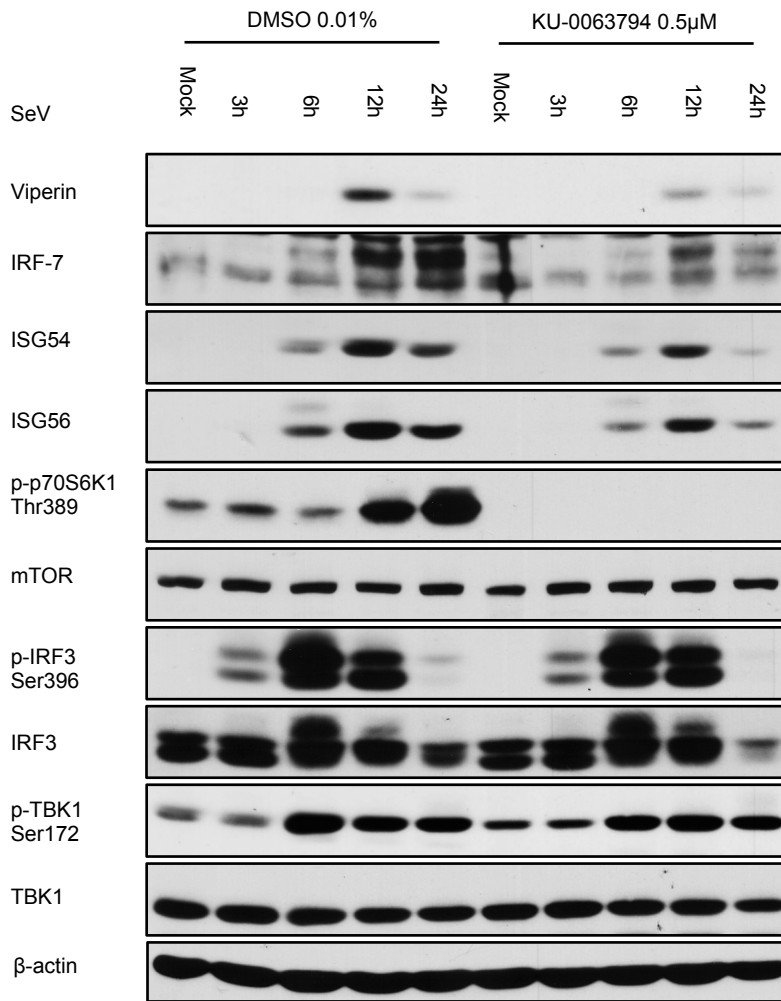
**Figure 11 : L'induction de la phosphorylation de mTOR sur la Ser2159 suivant une infection virale est indépendante de la réponse aux interférons et nécessite l'expression de TFG.**

(A-C) Les cellules MRC5 (A) ou les cellules HEC1B (B-C) ont été cultivées dans un milieu de culture dépourvu de sérum puis infectées avec le SeV (200 HAU/mL) pour les temps indiqués. Les extraits cellulaires ont été préparés puis soumis à une analyse par immunobuvardage en utilisant l'anticorps ciblant la forme phosphorylée de mTOR en Ser2159 ou l'anticorps contre la  $\beta$ -actine pour le contrôle interne. N = 1

(C) Les cellules HEC1B ont été prétraitées avec l'inhibiteur sélectif de TBK1, le MRT67307, ou le contrôle DMSO pendant 1h avant leur infection par le SeV en présence de MRT67307 ou de DMSO. Chacune des conditions a été exposée à l'inhibiteur ou au DMSO pendant une durée équivalente (25h). N = 1

(D) Des extraits cellulaires de cellules HeLa traitées avec les siRNA indiqués ont été utilisées pour une analyse par immunobuvardage. N = 2

L'implication de mTOR dans l'induction de certains ISGs a ensuite été confirmée en utilisant un inhibiteur de mTOR hautement sélectif, le KU-0063794. Le prétraitement de MRC5 par le KU-0063794 diminue l'expression de certains ISGs suivant une infection virale. En effet, la production de Viperin, IRF7, ISG54, et ISG56 a été affectée par une telle approche (chapitre 3, figure 12). D'un autre côté, l'activation de la voie des RLRs n'a pas été modifiée; la phosphorylation d'IRF3 (Ser396) et de TBK1 (Ser172) est demeurée inchangée (chapitre 3, figure 12).



**Figure 12 : L'activité kinase de mTOR est importante la production optimale des ISGs suivant une infection virale.**

Les fibroblastes primaires MRC5 ont été prétraités avec 0,5 μM de l'inhibiteur KU-0063794 ou son contrôle pendant 30 minutes avant d'être infectés avec du SeV (200 HAU/mL) pour les temps indiqués, et ce, en présence continue de l'inhibiteur ou de son contrôle. Les extraits cellulaires ont été préparés et assujettis à une analyse par immunobuvardage avec les anticorps inscrits. N = 1

## CHAPITRE 4 – DISCUSSION ET PERSPECTIVES

### 4.1 TFG – UN NOUVEAU MEMBRE STRUCTURANT DE LA VOIE DE SIGNALISATION CANONIQUE DES RLRs

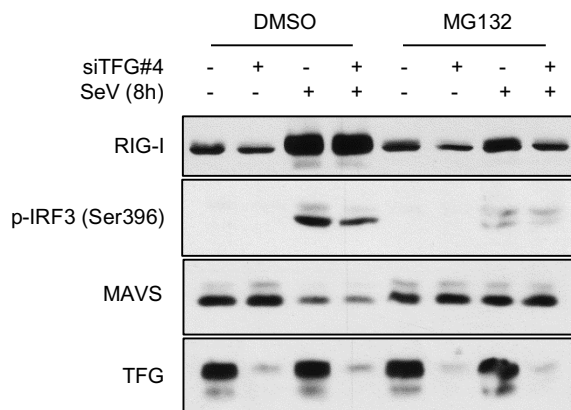
L'axe impliquant RIG-I, MAVS et TRAF3 est reconnu en tant que voie de signalisation fondamentale menant à une réponse antivirale de l'hôte à la fois rapide et puissante suivant une infection virale. Un nouveau paradigme propose que les RLRs dépendent en fait d'une machinerie intracellulaire de transport protéique de manière à établir le lien entre les sites de détection des virus et les plateformes signalétiques de la cellule (313, 320). La compartimentation de ces processus représente en fait un système de contrôle supplémentaire empêchant l'activation aberrante des voies de signalisation antivirales et, *ipso facto*, la survenue des conséquences associées. Illustrant ce concept, la protéine archétype des RLRs, RIG-I, doit se transloquer du compartiment cytosolique aux complexes contenant MAVS de manière à transmettre le signal adéquatement. Ce processus est initié par l'ubiquitination de RIG-I en Lys63 par les ubiquitines ligases E3 nommées Riplet et TRIM25 (248, 324). Ensuite, l'ubiquitination de RIG-I permet son association au chaperon cytosolique 14-3-3 $\epsilon$  qui mène à la redistribution de RIG-I vers certains compartiments membranaires. Ainsi, il a été proposé que RIG-I, TRIM25 et 14-3-3 $\epsilon$  forment un complexe de translocation qui permet le recrutement de RIG-I à MAVS (324). Alors que la régulation du transport des RLRs à leur adaptateurs respectifs représente un nouveau point de contrôle critique pour la transduction des signaux de l'immunité innée, les événements menant au recrutement et à l'organisation des effecteurs en aval demeurent grandement inconnus. Ici, nous avons donc présenté le rôle de TFG en tant que composante essentielle du complexe signalétique MAVS-TRAF3 dont la localisation sous-cellulaire permet le recrutement efficace de TRAF3 à son adaptateur en amont, MAVS. De ce fait, TFG représente une protéine importante dans l'activation d'IRF3 et dans l'expression subséquente des IFNs de type I et des ISGs.

#### 4.1.1 TFG ET LA RÉPONSE ANTIVIRALE INNÉE

L'étude présentée à même ce mémoire démontre le rôle moléculaire positif de TFG dans l'organisation d'une réponse antivirale adéquate suivant l'activation des RLRs. En fait, en utilisant à la fois des lignées cellulaires transformées (cellules HeLa, HEK293T) et des lignées cellulaires primaires, telles que les fibroblastes pulmonaires MRC5 dans lesquelles l'expression de TFG a été réduite par des approches d'interférence par ARN (c.-à-d. shRNA, siRNA), il nous a été possible de confirmer l'importance de TFG dans le maintien de la capacité des cellules à prévenir la réplication et la dissémination du VSV (chapitre 3, figure 6). En fait, puisque VSV est un virus hautement sensible aux interférons (429, 430), ceci suggère un rôle prépondérant de TFG dans la réponse aux IFNs. Confirmant cette notion, les expérimentations ELISA ont démontré le rôle de TFG dans l'expression et/ou la sécrétion des IFNs- $\beta$  (chapitre 3, figure 5C). Cette diminution observée dans la sécrétion d'IFNs- $\beta$  peut aussi être expliquée par le fait que TFG peut causer un délai substantiel dans la sécrétion de certaines protéines (374). De plus, dans les cellules HeLa et MRC5 dans lesquelles l'expression de TFG a été réduite, la production d'un sous-groupe d'ISGs dont l'induction est sous le contrôle transcriptionnel d'IRF3 a été diminuée comparativement à leurs cellules de contrôle respectives exprimant TFG (chapitre 3, figure 5A et 5B). Ainsi, par l'entremise de modèles expérimentaux faisant intervenir le VSV et SeV en tant que modèle viral activant RIG-I, il a été possible de démontrer le rôle de TFG dans la voie de signalisation des RLRs. Toutefois, le niveau auquel agit TFG demeurerait inconnu.

Certaines études antérieures ont identifié TRIM25, une E3 ubiquitine ligase, en tant que partenaire protéique de TFG suggérant ainsi un rôle de TFG dans la signalisation médiée par RIG-I (381). En effet, l'ubiquitination catalysée par TRIM25 de RIG-I en position Lys63 est importante pour son activation et son interaction subséquente avec MAVS. De manière intéressante, TRIM25 promeut aussi l'ubiquitination en Lys48 de certaines protéines cibles, incluant MAVS, en vue de leur dégradation par le protéasome (431-433). Notamment, certaines études ont démontré que lors d'une infection par un virus à ARN, l'expression de MAVS diminue

au fil du temps (395, 431). Paradoxalement, cette dégradation de MAVS régule positivement la signalisation antivirale, car cette perte d'expression de MAVS précède immédiatement la phosphorylation d'IRF3. Néanmoins, bien que TFG interagisse avec TRIM25, cette protéine semble jouer son rôle ultérieurement à l'activation de MAVS. En effet, la dégradation de MAVS secondaire à une infection au SeV demeure grandement inchangée lorsque l'expression de TFG est altérée dans les cellules HeLa (chapitre 3, figure 4A). En revanche, la déplétion de TFG affecte directement la transautophosphorylation de TBK1 sur la Ser172, et l'activation subséquente d'IRF3, proposant ainsi un rôle pour TFG dans la voie des RLRs en aval de la signalisation amorcée par MAVS (chapitre 3, figure 4B à 4D). Par ailleurs, conformément avec le fait que suivant une infection virale la dégradation de MAVS soit un prérequis à la pleine phosphorylation d'IRF3 (431), le prétraitement des cellules HeLa avec 10 nM de l'inhibiteur du protéasome MG132 a diminué le degré de phosphorylation d'IRF3 et la production de l'ISG RIG-I normalement observés (chapitre 4, figure 1). Toutefois, malgré le prétraitement des cellules avec le MG132, l'influence de l'absence de TFG sur la diminution de la phosphorylation d'IRF3 en Ser396 est maintenue (chapitre 4, figure 1). En somme, ces observations suggèrent que TFG agit en aval de l'activation et de la dégradation de MAVS.



**Figure 1 : TFG influence la phosphorylation d'IRF3 en aval de la dégradation de MAVS.**

Les cellules HeLa ont été traitées avec 40 nM de siTFG#4 ou son contrôle, puis prétraitées avec une solution de DMSO ou de MG132 à une concentration finale de 10 nM avant une infection virale au SeV pendant 8h. Les extraits cellulaires ont ensuite été analysés par immunobuvardage avec les anticorps mentionnés. Suivant une infection virale, la dégradation de MAVS précédant la phosphorylation activatrice d'IRF3 et la production subséquente de RIG-I peut être observée. Alors que la dégradation de MAVS n'est pas altérée suivant la diminution de l'expression de TFG, la phosphorylation d'IRF3

l'est. Par ailleurs, le traitement des cellules avec l'inhibiteur du protéasome prévient la dégradation de MAVS et une portion de la phosphorylation d'IRF3, de même qu'une réduction de la production de RIG-I. Néanmoins, la diminution de l'expression de TFG dans ces conditions inhibe tout de même la phosphorylation d'IRF3 et la production de l'ISG RIG-I. N=1

L'interaction entre RIG-I et MAVS mène au recrutement des membres de la famille d'adaptateur TRAF, incluant TRAF3, afin de favoriser l'établissement d'une réponse antivirale menée par IRF3 (242). En plus de TRAF3, de nombreuses protéines, telles que NEMO, TANK et TBK1, ont été rapportées comme étant des régulateurs critiques de la phosphorylation d'IRF3 et de la production d'IFNs reliées à l'axe signalétique impliquant MAVS (201, 434-436). TBK1 détient une robuste capacité à s'autophosphoryler et participe à de multiples voies de signalisation, incluant la réponse antivirale liée à la production des IFNs de type I et à l'autophagie (437-439). Des preuves croissantes révèlent aussi l'implication de l'activité aberrante de TBK1 dans une variété de cancers et de maladies auto-immunes (31, 440). Ainsi, en l'absence de stimuli cohérents avec son rôle physiologique, il existe de nombreux mécanismes régulateurs prévenant l'activation anormale de TBK1 (439). L'événement moléculaire principal qui contrôle l'activité de TBK1 demeure la phosphorylation de sa Ser172 située dans la boucle T (*T-loop*) de son domaine kinase (441, 442). Se trouvant sous forme homodimérique dans une configuration limitant son autophosphorylation, TBK1 doit subir une modification post-traductionnelle impliquant l'ajout de chaînes d'ubiquitines liées en position Lys63 afin de devenir active (332, 443, 444). Dans la voie de signalisation impliquant les RLRs, de nombreuses ligases E3 participent à une telle ubiquitination, incluant TRAF3 (330). De ce fait, lors d'une infection virale, TBK1 est recruté au niveau de complexes signalétiques composés, entre autres, de TRAF3, afin de subir sa polyubiquitination en Lys63 permettant ainsi une interaction interdimère qui mène à la transautophosphorylation activatrice de TBK1 sur sa Ser172. De plus, la présence de protéines d'échafaudage permettant le recrutement de TBK1 à TRAF3 représente un mécanisme de régulation supplémentaire afin de contrôler précisément l'activation de TBK1 (435, 443). En ce qui a trait à la production d'IFN- $\beta$ , la protéine d'assemblage TANK, partenaire de TRAF3, a été démontrée comme étant essentiel

dans l'établissement du lien entre TBK1 et le complexe composé de MAVS (434). Similairement, NEMO se lie à la forme ubiquitinée de TBK1 contribuant ainsi à la formation d'un signalosome fonctionnel (436). Par contre, bien que TANK et NEMO semblent favoriser le rapprochement entre TBK1 et TRAF3 avec MAVS, les détails moléculaires sous-tendant l'organisation de tels complexes demeurent irrésolus. Ici, nous avons identifié TFG en tant que membre d'un complexe moléculaire comprenant au moins TRAF3 et TBK1 (chapitre 3, figure 3B). L'expression de TFG est nécessaire au recrutement de TBK1 à TRAF3 suivant une infection virale (chapitre 3, figure 4A et 4B). D'autre part, le fait qu'une étude ait démontré que TFG interagit physiquement avec NEMO et TANK suggère aussi un rôle de TFG dans l'activation d'IRF3 dépendante de TBK1 (350).

En plus de TRAF3, MAVS recrute aussi les ligases d'ubiquitines TRAF2 et TRAF6 afin de soutenir la réponse inflammatoire orchestrée par NF- $\kappa$ B (242). Toutefois, le fait que TFG ne détienne pas la capacité de se lier aux formes surexprimées de TRAF2 ou TRAF6 supporte plutôt une implication spécifique de TFG dans la signalisation dépendante de TRAF3 et d'IRF3 (chapitre 3, figure 1C). Néanmoins, puisque TANK et NEMO interagissent avec TFG et qu'elles demeurent des protéines adaptatrices promouvant le rapprochement entre les voies de signalisation de NF- $\kappa$ B et d'IRF3, un rôle de TFG dans l'activation de NF- $\kappa$ B ne peut être exclu.

#### **4.1.2 TFG ET LE TRAFIC DES PROTÉINES**

MAVS est une protéine transmembranaire qui se situe au niveau de différents compartiments sous-cellulaires incluant la mitochondrie, le peroxyosome, de même que le MAM (278, 320). Alors que chacun de ces centres de signalisation est important, la localisation de MAVS à l'intérieur des MAMs permet la formation d'un cadre dynamique allouant la transmission d'informations entre les organelles menant ainsi à une organisation efficace des réponses immunitaires antivirales. De manière intéressante, TFG est une protéine résidant à même les compartiments entre le ER et l'appareil de Golgi (chapitre 3, figure 2A et 2B) et semble aussi se trouver à une interface entre le ER et les organelles comportant MAVS (chapitre 3, figure 3D).

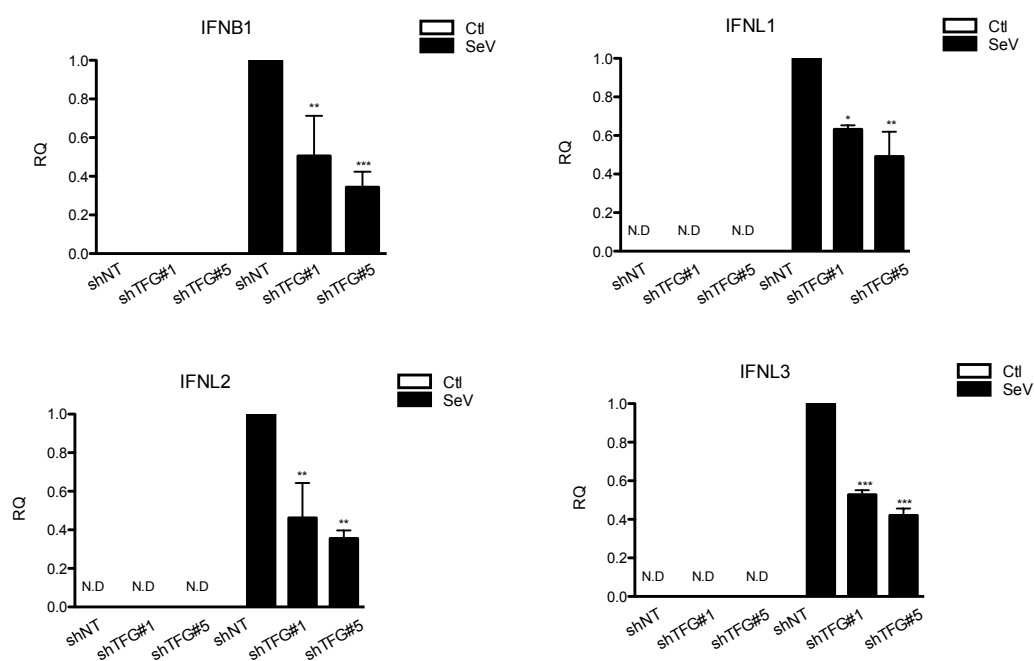
L'importance des MAMs dans la signalisation en aval de la reconnaissance des virus par RIG-I est soutenue par le fait que les protéases du NS3/4A du virus de l'hépatite C ciblent spécifiquement le sous-groupe de MAVS lié aux MAMs, atténuant ainsi la réponse antivirale (258). De plus, à l'instar de RIG-I, qui se transloque du cytosol vers le compartiment membranaire MAM afin d'y lier MAVS, la protéine TRAF3 qui se trouve aux abords du ER se meut aussi vers les MAMs suivant une infection virale (258). Tel que mentionné auparavant, certaines études ont démontré le rôle de TFG dans la voie sécrétoire qui contrôle la distribution correcte des protéines à l'intérieur des cellules (374, 375, 445). En effet, TFG est impliqué dans la biogenèse des vésicules recouvertes des protéines COPII et influence leur transit entre le ER et l'ERGIC, un centre de tri pour les cargaisons (374, 375, 445). En fait, la polymérisation de TFG facilite l'assemblage de la protéine essentielle de l'ERES, Sec16A, avec les autres sous-unités du COPII de manière à permettre un export efficace des protéines du ER vers d'autres organelles (374, 375, 445). De manière conséquente, les cellules dépourvues de TFG sont incapables de recruter efficacement TRAF3 à MAVS suivant une infection par un virus à ARN (chapitre 3, figure 4A). Conformément à ces observations, nous avons précédemment identifié Sec16A en tant que protéine importante permettant l'interaction entre TRAF3 et MAVS lors d'une infection virale (340). De plus, l'importance de la voie sécrétoire est soulignée par le fait que certains virus ciblent le trafic des vésicules COPII afin de compromettre l'immunité innée et favoriser la réplication virale. En fait, les protéines p22 non structurelles de différents *Norovirus* ont démontré comme leur capacité à inhiber le trafic des vésicules COPII, menant ainsi au démantèlement de l'appareil de Golgi et à la défaillance de la sécrétion protéique dépendante du Golgi (446, 447). En outre, les bactéries *E. Coli*, et les virus de la famille des *Picornaviridae* et *Rotaviridae*, sont aussi en mesure de perturber la voie sécrétoire précoce, suggérant un rôle pour ce système dans l'immunité antimicrobienne globale (448).

D'autre part, le flux membranaire généré par TFG demeure important pour le maintien d'une configuration adéquate des organelles. Notamment, la déplétion de TFG altère la morphologie du ER de même que la distribution des mitochondries, et désorganise les réseaux de l'ERGIC et du Golgi (375, 376). Tel que mentionné



précédemment, les mitochondries dans les cellules dépourvues de TFG se regroupent en amas plutôt qu'en un motif plus dispersé. Par ailleurs, Sec16B, une protéine ayant été comme pouvant interagir avec TFG, représente un élément clé dans la biogenèse de peroxysomes, un des lieux de signalisation de MAVS (375, 449, 450). Ceci appuie une fois de plus le rapprochement et le lien de co-dépendance entre TFG, la voie sécrétoire et la formation d'une synapse signalétique d'où MAVS peut orchestrer une réponse antivirale prompt et efficace. De manière intéressante, la signalisation de MAVS initiée à partir de ces différentes organelles (peroxysomes, MAMs, mitochondries) semble permettre une expression différentielle de certains gènes, incluant les IFNs. En fait, à partir des peroxysomes, MAVS est en mesure d'induire les ISGs et de contrôler les infections virales indépendamment des IFNs de type I (257). En effet, les lignées cellulaires transgéniques exprimant préférentiellement MAVS auprès de peroxysomes n'induisent que des IFNs de type III en réponse à différents ligands intracellulaires (327). Similairement, l'accentuation de l'abondance peroxysomale ou l'inhibition de la fonction mitochondriale favorise l'expression des IFNs de type III comparativement à ceux de type I (451). L'importance probable de TFG dans la régulation de la dispersion des mitochondries, du maintien des structures du ER et de la genèse des peroxysomes, suggère donc un rôle central de cette protéine dans la production des IFNs de type I, mais aussi des IFNs de type III. Le fait que la diminution de l'expression de TFG par shRNA amenuise la production des transcrits des gènes *IFNB1*, mais aussi ceux des *IFNL1*, *IFNL2*, *IFNL3* appuie cette hypothèse (chapitre 4, figure 2). L'effet probable de TFG dans la biogenèse des peroxysomes pourrait être particulièrement important dans les cellules épithéliales des muqueuses dont la défense antivirale dépend majoritairement de la production d'IFNs de type III. En fait, la polarisation des cellules épithéliales mène à une augmentation de la quantité de peroxysomes qui, par conséquent, favorise une production biaisée vers les IFNs de type III en réponse aux infections virales (327). L'importance de la genèse des peroxysomes dans la signalisation précoce antivirale est soutenue par le fait que la dégradation et/ou la séquestration de Pex19, une protéine provenant du ER essentielle à la formation des peroxysomes, par une protéine de la capsid des Flavivirus mènent à une perte des

peroxysomes et à une réduction de la production des IFNs de type III (452). Ainsi, la préservation des échanges entre le ER et les péroxyosomes en devenir marque un moment important dans la formation de la réponse aux IFNs de type III; TFG, en maintenant un contact étroit entre le ER et les péroxyosomes, de même qu'en régulant potentiellement leur biogenèse, pourrait d'ailleurs y jouer un rôle prépondérant.



**Figure 2 : L'expression de TFG est nécessaire à la transcription des IFNs de type I et de type III.**

Les fibroblastes primaires MRC5 ont été infectés avec différents vecteurs lentiviraux codant pour différents shRNA dirigés contre TFG (shTFG#1 ciblant la partie codante de TFG ou #5 ciblant la portion 5'UTR de TFG) ou un shRNA contrôle sans cible (shNT) à un MOI de 2. Puis, suivant leur sélection par traitement à la puromycine tel que décrit dans la section Matériel et Méthode de l'article du chapitre 3, les cellules ont été laissées non stimulées (Ctl) ou infectées au SeV pendant 8h. L'ARN des cellules a ensuite été isolé, puis l'abondance des gènes identifiés a été quantifiée par qPCR. L'expression relative d'ARNm a été calculée en fonction de la formule des seuils de comparaison (Ct; comparative threshold)  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  où  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{contrôle}}$  et  $\Delta Ct = Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{contrôle endogène}}$ . Le résultat moyen combiné de duplicatas est montré. (\* P-value < 0,05, \*\* P-value < 0,01, \*\*\* P-value < 0.001)

D'un autre côté, le maintien de tels contacts entre les organelles est aussi important dans la signalisation suivant la reconnaissance de virus à ADN. En effet, l'adaptateur central STING se situe au niveau du ER à l'état basal et transite ensuite vers des points cytosoliques lors son activation par les senseurs d'ADN. Un de ces senseurs, IFI16, reconnaît en fait l'ADN viral au niveau du noyau. Suivant la reconnaissance de virus à ADN au niveau nucléaire, il doit ensuite transiter auprès de

STING au niveau du ER afin d'induire sa signalisation (323). De manière intéressante, IFI16 semble aussi nécessaire à la pleine activation de cGAS (311, 312). Un rôle hypothétique de TFG à ces niveaux peut être déduit du fait qu'il est un partenaire potentiel d'IFI16 (384). TFG pourrait donc faciliter son recrutement auprès de cGAS et STING au niveau du ER afin d'initier la signalisation (384). Ceci suggère ainsi un rôle possible de TFG dans la synchronisation et l'organisation des complexes signalétiques suivant une infection aux virus à ADN.

En somme, TFG permet le rapprochement entre de nombreuses composantes protéiques de la défense innée contre les virus à ARN, de manière à favoriser la réponse transcriptionnelle antivirale à travers l'activation d'IRF3. Au demeurant, bien que la production des protéines antivirales suivant la reconnaissance d'un virus nécessite l'induction de leur ARNm respectif par l'activation de différents facteurs de transcription, l'action optimale et soutenue de la machinerie cellulaire de traduction est tout aussi primordiale.

## **4.2 TFG ET LA JUXTAPOSITION DE MTOR ET DE TBK1 : IMPRESSIONS ET PERSPECTIVES**

À la lumière des résultats préliminaires ci-haut présentés, il est maintenant possible d'établir un rapprochement potentiel entre l'activation de la voie des RLRs en réponse à une infection virale et celle de mTOR grâce à l'identification de TBK1 en tant que kinase responsable de la phosphorylation en Ser2159 de mTOR, une modification qui favorise l'autophosphorylation activatrice de mTOR en Ser2481. Cette succession d'événements semble dépendre de la présence de TFG et se déroule suivant une activation de la voie des RLRs par le SeV d'une manière indépendante des IFNs.

Ces résultats concordent avec les observations comme quoi la voie de PI3K-mTOR est stimulée suivant l'activation de différents PRRs, incluant les TLR3, 4, 9 et RIG-I (453-455). Ce lien entre TBK1 et mTOR semble d'ailleurs dépendre de la présence de TFG, suggérant ainsi un rôle de cette dernière dans la voie PI3K-mTOR. De manière intéressante, une étude visant à déterminer par spectrométrie de masse l'interactome de la protéine *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), une phosphatase qui s'oppose à l'activité kinase de PI3K, a identifié TFG en tant que

nouveau partenaire dans la lignée cellulaire UMUC-3, un modèle humain de cancer de la vessie (383). Qui plus est, l'homologue de TFG exprimé dans les grenouilles *Xenopus laevis* (xTFG) présente un motif de liaison lui permettant d'interagir avec les domaines SH3 de Src, un activateur de la voie PI3K, et de la sous-unité régulatrice de la PI3K, p85 (351). À cet effet, l'identification de la Tyr33 de TFG en tant que substrats de la kinase c-Src dans les cellules HEK293T représente un lien supplémentaire entre TFG et la voie PI3K (380). Toutefois, le rôle de telles associations en réponse à une infection virale demeure à être déterminé. D'un autre côté, les présentes observations proposent plutôt un rapprochement direct entre TBK1 et mTOR indépendamment de l'activation de la PI3K. En effet, l'essai kinase propose une phosphorylation de mTOR par TBK1 sans intermédiaire (chapitre 3, figure 10B). Ceci concorde d'ailleurs directement avec les résultats récemment publiés démontrant la phosphorylation de mTOR par TBK1 en réponse à l'activation de TLR3 et TLR4 (456). Parallèlement, une étude a aussi démontré que la diminution de la réplication du HCV par les IFN- $\alpha$  était altérée suivant un traitement de rapamycin, un inhibiteur de mTORC1, mais demeurait inchangée suivant le traitement avec un inhibiteur de la PI3K ou d'Akt, suggérant un mode d'activation de mTOR distinct qui ne nécessite pas la contribution de la voie PI3K-Akt (457). L'interconnexion entre TBK1 et mTOR suivant l'activation de RIG-I par le SeV présente ainsi un mécanisme moléculaire alternatif d'une telle activation qui est indépendant de la voie PI3K-Akt. Ce nouveau lien semble par ailleurs nécessiter l'expression de la protéine TFG (chapitre 3, figure 9B et 11D).

D'autre part, un groupe de recherche a récemment démontré qu'une infection virale avec un virus à ADN promulguait l'interaction entre l'effecteur en aval de mTOR, p70S6K1, et l'adaptateur de signalisation STING, d'une manière dépendante du senseur à ADN, cGAS. L'interaction entre STING et p70S6K1 serait de surcroît favorisée par TBK1 par un mécanisme inconnu. La formation subséquente du complexe triparti p70S6K1-STING-TBK1 permettrait la pleine activation d'IRF3 (458). Bien que nos résultats préliminaires ne semblent pas admettre un rôle de mTOR dans l'activation du facteur de transcription IRF3 (chapitre 3, figure 12), la phosphorylation de mTOR par TBK1 et l'activation subséquente de p70S6K1 de

manière à favoriser la formation du complexe p70S6K1-TBK1-STING pourrait tout de même expliquer le mécanisme par lequel TBK1 favorise le recrutement de p70S6K1 auprès de STING. Il serait donc intéressant de déterminer la capacité de TFG à contrôler un tel recrutement suivant une infection par un virus à ADN. À cet effet, suivant une stimulation de cellules avec du poly(dA:dT), un analogue synthétique d'ADN, les protéines endogènes mTOR et TBK1 sont recrutées auprès de TFG suggérant ainsi un rôle de TFG dans la réponse antivirale aux virus à ADN (donnée non montrée). D'un autre côté, bien qu'un rôle de mTOR dans le recrutement de p70S6K1 auprès de TBK1 dans la voie d'activation d'IRF3 ne peut être exclu, les résultats ci-haut présentés suggèrent plutôt un rôle de TBK1 dans l'activation TFG-dépendante de mTOR de manière à favoriser la traduction protéique de certains ISGs (chapitre 3, figure 9 à 12).

mTORC1 représente un complexe intégrant une multitude de stimuli extra- et intracellulaire et représente ainsi le lieu de convergence de plusieurs signaux visant à réguler la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, la motilité cellulaire, l'autophagie, et la synthèse protéique (459). Cette influence au niveau du contrôle de la traduction coiffe dépendante a été considérablement étudiée (460-462). En phosphorylant les 4EBPs, mTOR favorise leur dissociation de eIF4E permettant ainsi l'assemblage du complexe eIF4F et la traduction coiffe dépendante (463, 464). Tel que mentionné, ces événements affectent la synthèse protéique globale et diminuent fortement la traduction des transcrits comportant de longs et structurés 5'UTRs, tel qu'IRF7 (465). De plus, bien que les p70S6Ks exercent une influence sur la régulation de la biogenèse des ribosomes, ces protéines modulent aussi l'initiation de la traduction en réponse à l'activation de mTORC1. En effet, en phosphorylant PDCD4 et l'eIF4B, les p70S6Ks stimulent la traduction des ARNm présentant des 5'UTRs ayant de nombreuses structures secondaires, telles que Bcl-2, XIAP (419, 466, 467). L'activation de mTOR par TBK1 suivant une infection virale pourrait donc soutenir la réponse antivirale précoce en favorisant la production d'ISGs, tels qu'IRF7, ISG54 et Viperin. De plus, le fait que la réduction du niveau d'expression de TBK1 par shRNA dans les cellules HEC1B réduise l'assemblage de polysomes sous-tend le rôle

probable de TBK1 dans la modulation des étapes d'initiation et d'élongation de la traduction protéique (données non montrées).

Cette prédisposition de TBK1 à promouvoir à la fois la transcription dépendante d'IRF3 et la traduction efficace de certains ARNm présente un mécanisme potentiel d'augmentation rapide de la reconnaissance des pathogènes et/ou d'amplification de la réponse aux IFNs. L'activation de la traduction précocement suivant la reconnaissance d'un virus pourrait par ailleurs stimuler la production de protéines antivirales dont les ARNm sont déjà exprimés en faible quantité, incluant ceux de l'IFN- $\beta$ , de l'IRF7 et de Viperin (387, 468). Dans ce contexte, il est intéressant de voir que dans les fibroblastes primaires MRC5, la phosphorylation de mTOR en Ser2159 ne semble que momentanée (chapitre 3, figure 11A). Cette activation transitoire et rapide de mTOR par TBK1 suivant l'activation des RLRs pourrait en fait permettre de stimuler la production initiale des protéines antivirales clés telles que les interférons, et ce, avant que certaines protéines précoces telles qu'ISG54 ou 56 et, plus tardivement, PKR bloquent activement la traduction. La diminution de la phosphorylation de mTOR dans un deuxième temps pourrait aussi être secondaire à une boucle de rétroaction négative initiée par p70S6K1. En effet, lorsque la voie PI3K/mTOR est suractivée, p70S6K1 est en mesure de limiter la signalisation de cette voie (469-471). Bien qu'un tel rôle de p70S6K n'est encore été identifié dans la réponse antivirale, de récentes preuves démontrant que l'activation chronique de TBK1 supprimerait l'activité de mTORC1 soutiennent cette hypothèse (472). Dans cette étude, les souris dépourvues de la *three-prime repair exonuclease 1* (Trex1), une enzyme ayant la capacité de cliver l'ADN cytosolique, souffrent d'une inflammation systémique causée par une activation constante de la voie cGAS-STING-TBK1. L'activation de cette voie provoquerait le recrutement de TBK1 au sein d'un complexe comprenant mTOR, Raptor et 4EBP, menant, à terme, à l'inhibition de la phosphorylation de rpS6 (472). Cette dernière inhibition pourrait en fait être le résultat paradoxal d'une surstimulation initiale de cette voie de signalisation. D'autre part, l'activité de mTORC1 peut aussi être inhibée par différentes voies induites par le stress cellulaire. Par exemple, pendant une infection virale, une période d'hypoxie peut survenir étant donné que le taux d'activité

métabolique et synthétique surpasse le niveau normal des cellules non infectées (473). L'hypoxie inhibe en fait mTORC1 en activant les TSCs à travers l'induction de REDD1, une cible transcriptionnelle du *hypoxia-inducing factor 1* (HIF1) (474-476). Notamment, suivant une période d'hypoxie, un de nos résultats préliminaires démontre que TBK1 est impliqué dans l'expression de HIF1 grâce à sa capacité d'augmenter la traduction de son ARNm (donnée non montrée). Ces différents effets pourraient donc expliquer comment l'activation chronique de TBK1 mènerait à une inhibition éventuelle de mTORC1.

En somme, à travers le recrutement de TBK1 à mTOR suivant une infection virale, TFG serait en mesure de prémunir les cellules d'une défense adéquate par la production rapide de protéines antivirales essentielles à leur survie. Puis, suivant la production d'ISGs limitant la traduction et/ou par l'inhibition ultérieure de mTOR, TFG préviendrait l'essor de l'infection en réduisant la réplication des virus dont la croissance dépend du système endogène de traduction. L'importance de ce phénomène est d'ailleurs appuyée par le fait que certains virus ont évolué de manière à s'affranchir du mode de réplication dépendant du complexe eIF4F sous contrôle de mTOR et des réponses induites par le stress cellulaire (396). Cette évolution est particulièrement fréquente pour les virus à ARN. Ce faisant, de nombreux ARNm viraux traduisibles sont exempts de coiffe en 5' et utilisent plutôt des *internal ribosome entry sites* (IRESs) pour initier leur traduction. Par le fait même, les IRESs viraux peuvent lier directement les sous-unités ribosomales 40S et ainsi contourner la nécessité d'utiliser de nombreux facteurs d'initiation, incluant eIF4F (477, 478). De plus, ces virus développent souvent des mécanismes perturbant l'activité d'eIF4F visant à limiter la traduction dépendant de la coiffe (479). Nonobstant, la production d'IFNs et d'ISGs demeure centrale dans la défense de l'hôte aux infections.

Récemment, Li et coll. ont décrit un nouveau mécanisme de défense stimulé par les IFN- $\alpha$ . En fait, en produisant des exosomes, certaines cellules sont en mesure d'effectuer un transfert intercellulaire d'agents antiviraux qui permettrait aux cellules avoisinantes de résister aux pathogènes (480). Ceci pourrait être particulièrement important afin de faciliter la défense de cellules dont les voies de réponses antivirales ont été antagonisées par les virus. Bien que les étapes précises de la biogenèse des

exosomes demeurent grandement inconnues, un des importants facteurs à cet effet est TSG101, une protéine endolysosomale impliquée dans la machinerie de l'*endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT). Certains virus incluant le VIH, l'IAV et le virus d'Ebola ont aussi évolué de manière à subvertir les composantes de l'ESCRT afin de favoriser leur bourgeonnement (481-483). Les ESCRT détiennent aussi un rôle essentiel dans le tri des protéines qui seront acheminées vers des vésicules qui seront dégradées à travers leur fusion avec le lysosome. Au centre de cette opposition entre les fonctions physiologiques et pathologiques, les cellules se sont adaptées afin de limiter l'activité de TSG101 lors d'une infection virale, en provoquant notamment son ISGylation (481, 484, 485). En effet, en réponse aux interférons, la production d'ISG15 et sa conjugaison par l'action consécutive de l'enzyme activatrice E1, de l'enzyme de conjugaison E2 et de la ligase E3, permet de limiter le bourgeonnement des virus, la production d'exosomes, tout en favorisant la destruction des vésicules et de leur contenu par fusion lysosomale (485, 486). Puisque TFG est nécessaire à l'induction optimale d'ISG15 suivant une infection virale, sa régulation pourrait influencer l'activité de TSG101. En fait, présent au niveau des endosomes (chapitre 3, figure 2A), TFG a aussi été identifié en tant que partenaire potentiel de TSG101 (487, 488) et de TRIM25, une E3 ligase pouvant catalyser l'ISGylation de protéines (381). Bien que la ligase favorisant l'ISGylation de TSG101 n'ait pas été identifié, sa liaison possible avec TRIM25 (489) favorise une situation où TFG pourrait faciliter le rapprochement entre ces protéines et ainsi permettre la régulation de TSG101 et ainsi, influencer le bourgeonnement des virus et/ou la dégradation endolysosomale de certaines protéines virales et endogènes.

De par sa capacité à lier un grand nombre de molécules et en favorisant l'organisation du transport intracellulaire de protéines, TFG présente de nombreux effets envisageables dans la coordination, la répartition et le soutien des systèmes de la réponse antivirale innée. Néanmoins, peu d'informations concernant la régulation même de TFG sont connues. Quelques pistes de sa régulation post-traductionnelle ont été déterminées lors de la caractérisation du rôle de TRIM68, une ubiquitine ligase. En fait, TRIM68 favoriserait la dégradation lysosomale de TFG en catalysant



son ubiquitination. Ce faisant, TRIM68 aurait un rôle négatif dans l'induction des IFN- $\beta$  (490). D'autre part, l'identification de TFG en tant que substrat possible de la tyrosine kinase c-Src représente une piste supplémentaire de la régulation de l'activité de TFG, particulièrement dans la voie PI3K/mTOR (380). Similairement, l'identification du phosphoprotéome des MEFs *Tsc2*<sup>-/-</sup>, présentant une activation constitutive de mTORC1, a permis la détection de TFG en tant que substrats de la voie de mTORC1 ou d'une de ses kinases en aval (491). Un effort visant à caractériser plus précisément les modes de régulation post-traductionnelle de TFG pourra définitivement mieux décrire les subtilités de ses effets dans l'immunité innée, de même que dans certaines pathologies.

## CHAPITRE 5 – CONCLUSION

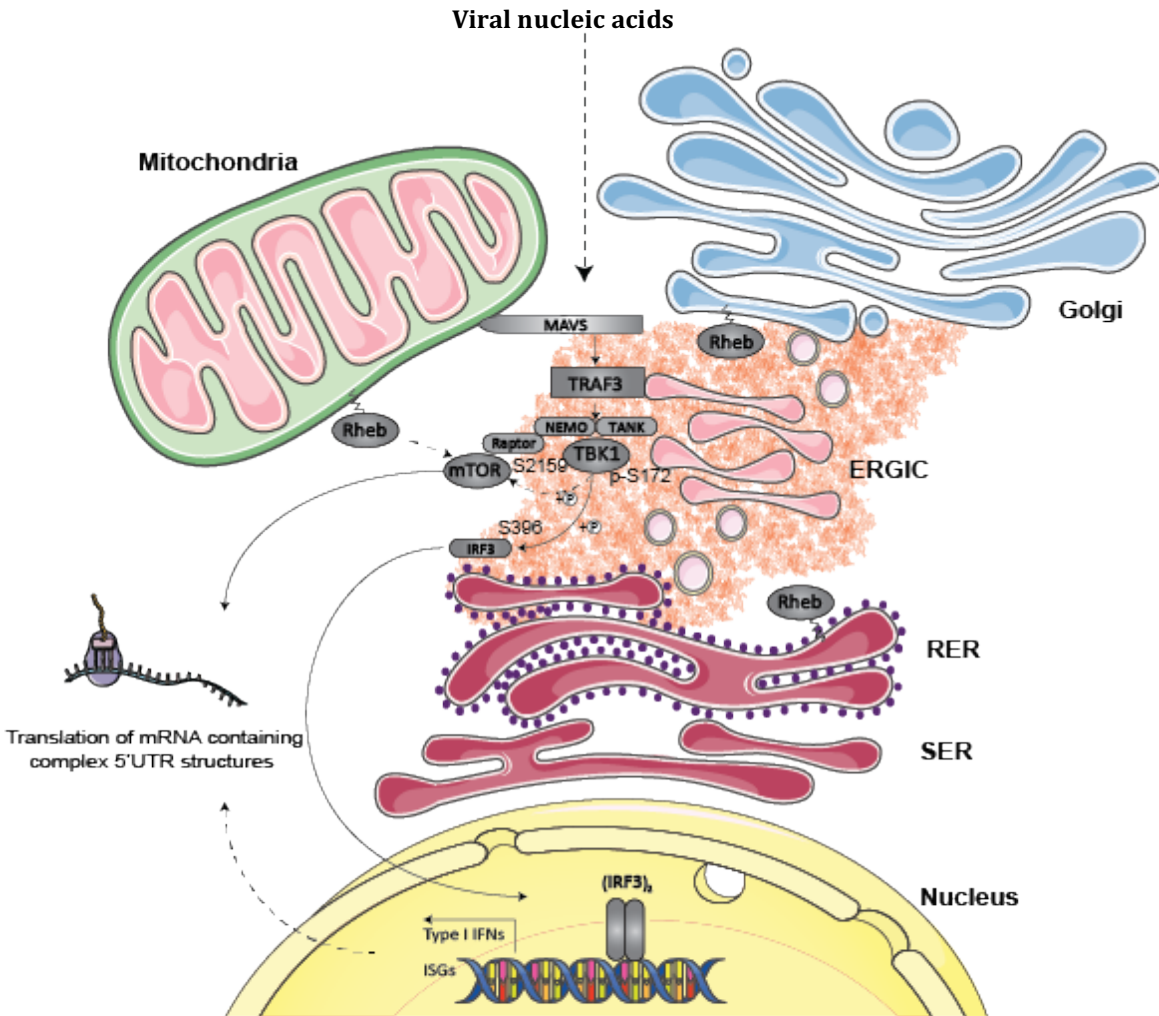
L'identification de la fine régulation des mécanismes moléculaires qui soutiennent et régulent la formation d'une réponse immunitaire adéquate demeure importante à la découverte éventuelle de nouvelles cibles thérapeutiques en immunité. La caractérisation des déterminants moléculaires contrôlant la réponse antivirale pourrait donc permettre de stimuler le développement de traitements antiviraux visant à renforcer et optimiser la réponse de l'hôte. Ce faisant, alors que la majeure partie des traitements antiviraux actuels sont virostatiques, ces nouveaux agents immunomodulateurs seraient plutôt virocides et auraient un large spectre d'activité. Par ailleurs, un tel développement d'immunothérapies aura aussi un impact important sur le traitement des maladies autoimmunes et des cancers.

Les résultats présentés à même ce mémoire démontrent le rôle d'un nouveau régulateur positif de la réponse antivirale innée, la protéine *TRK-Fused Gene*. En somme, TFG semble permettre le rapprochement entre de nombreuses composantes protéiques de la défense innée contre les virus à ARN. Cet effet pourrait être expliqué par sa capacité à interagir avec différentes protéines de manière favoriser l'établissement d'un macrocomplexe comprenant minimalement MAVS, TRAF3 et TBK1. La création de ce complexe pourrait aussi provenir du rôle structurant de TFG, dont l'expression permet de maintenir les contacts nécessaires entre les organelles. Ce faisant, TFG, par son rôle au niveau du système de transport protéique et par sa capacité à interagir directement avec de nombreux partenaires, semble fournir une structure charnière pour le développement d'un réseau de signalisation menant globalement à l'activation de TBK1, à l'augmentation subséquente de l'activité transcriptionnelle d'IRF3 et à la production éventuelle d'IFNs et d'ISGs (chapitre 5, figure 1).

Par ailleurs, la caractérisation du rôle de TFG a permis d'établir un nouveau lien entre la voie de signalisation des RLRs et l'activation de la voie impliquant mTOR. Le réseau formé de polymères de TFG semble en fait permettre le positionnement adéquat des effecteurs canoniques des RLRs auprès de mTOR de manière à stimuler sa phosphorylation et son activation (chapitre 5, figure 1). Ce

faisant, en assurant le maintien de l'organisation organellaire et en favorisant le transport des protéines, TFG semble jouer plusieurs rôles visant à stimuler la transcription, de même que la traduction des facteurs antiviraux.

Globalement, ce nouveau modèle de la signalisation de l'immunité innée établit ainsi un lien fonctionnel direct entre l'activation adéquate de l'effecteur transcriptionnel TBK1 et celle de l'effecteur traductionnel mTOR de manière à assurer une production efficiente de protéines antivirales. Les kinases TBK1 et mTOR, ayant chacune des rôles variés au niveau des voies de la survie et de la croissance cellulaire, de l'autoimmunité et de l'autophagie, la découverte de leur régulation par TFG aura sans doute de nombreuses répercussions sur le domaine de l'immunité, mais aussi au niveau des maladies autoimmunes et des cancers.



**Figure 1 : Modèle unifié proposé du rôle de TFG.**

TFG, ici représenté par une matrice polymérique de couleur orange, facilite l'assemblage des vésicules de transport COPII au niveau de l'ERES de manière à favoriser l'export de protéines du ER vers les autres organelles. Par ailleurs, ce réseau permet le rapprochement de différents compartiments sous-cellulaires incluant le ER, l'ERGIC, l'appareil de Golgi et la mitochondrie. En favorisant de tels contacts et en interagissant directement avec de nombreux effecteurs de l'immunité innée, TFG semble permettre la formation du macrocomplexe moléculaire fonctionnel composé de MAVS, TRAF3, TBK1 et potentiellement TANK et NEMO. Ainsi, suivant la reconnaissance d'acides nucléiques viraux, TFG permet l'autophosphorylation activatrice de TBK1 en Ser172. Ce faisant, TBK1 stimule l'activité d'IRF3 à travers sa phosphorylation au niveau de la Ser396 ce qui mène subséquemment à la transcription des IFNs de type I et de nombreux ISGs. Les résultats préliminaires suggèrent par ailleurs que TFG serait en mesure d'établir un rapprochement entre TBK1 et mTOR. Dans ce microenvironnement, mTOR deviendrait pleinement actif suivant son interaction avec les GTPases Rheb environnantes et sa phosphorylation directe par TBK1 sur sa Ser2159. Globalement, TFG favoriserait ainsi la signalisation de l'immunité innée en couplant l'activation des effecteurs transcriptionnels (TBK1) au effecteurs de la traduction (mTOR) de manière à favoriser la production rapide et efficace de protéines possédant une activité antivirale. Le modèle a été créé en utilisant les gabarits de *Servier Medical Art* sous une licence non restrictive CCBY 3.0 (<https://smart.servier.com/>).

## RÉFÉRENCES

1. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
2. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1999;64:429-35.
3. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5(10):987-95.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.
5. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449(7164):819-26.
6. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001;410(6832):1099-103.
7. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:447-80.
8. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):240-73, Table of Contents.
9. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6(2):135-42.
10. Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science.* 2001;294(5543):870-5.
11. Carveth HJ, Bohnsack JF, McIntyre TM, Baggiolini M, Prescott SM, Zimmerman GA. Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;162(1):387-93.
12. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature.* 1999;398(6729):718-23.
13. Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev.* 2002;186:37-46.
14. Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity.* 2016;44(3):463-75.
15. Lim JJ, Grinstein S, Roth Z. Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:191.

16. Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:547-78.
17. Daigo K, Inforzato A, Barajon I, Garlanda C, Bottazzi B, Meri S, et al. Pentraxins in the activation and regulation of innate immunity. *Immunol Rev.* 2016;274(1):202-17.
18. Mattar EH, Almehdar HA, Yacoub HA, Uversky VN, Redwan EM. Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;28:95-111.
19. Carroll MC, Fischer MB. Complement and the immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(1):64-9.
20. Matsushita M, Fujita T. The role of ficolins in innate immunity. *Immunobiology.* 2002;205(4-5):490-7.
21. Endo Y, Takahashi M, Fujita T. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology.* 2006;211(4):283-93.
22. Gaboriaud C, Juanhuix J, Gruez A, Lacroix M, Darnault C, Pignol D, et al. The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46974-82.
23. Degn SE, Thiel S. Humoral pattern recognition and the complement system. *Scand J Immunol.* 2013;78(2):181-93.
24. Bryant CE, Orr S, Ferguson B, Symmons MF, Boyle JP, Monie TP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVI. Pattern recognition receptors in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2015;67(2):462-504.
25. Drake MG, Kaufman EH, Fryer AD, Jacoby DB. The therapeutic potential of Toll-like receptor 7 stimulation in asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2012;11(6):484-91.
26. O'Neill LA, Bryant CE, Doyle SL. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev.* 2009;61(2):177-97.
27. Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol.* 2012;13(6):535-42.
28. De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol.* 2011;32(8):373-9.
29. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2005;11(2):191-8.
30. Lin YT, Verma A, Hodgkinson CP. Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms. *Curr Genomics.* 2012;13(8):633-45.

31. Clement JF, Meloche S, Servant MJ. The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. *Cell research*. 2008;18(9):889-99.
32. Ichikawa HT, Williams LP, Segal BM. Activation of APCs through CD40 or Toll-like receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease. *J Immunol*. 2002;169(5):2781-7.
33. Waldner H, Collins M, Kuchroo VK. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest*. 2004;113(7):990-7.
34. Dieude P, Dawidowicz K, Guedj M, Legrain Y, Wipff J, Hachulla E, et al. Phenotype-haplotype correlation of IRF5 in systemic sclerosis: role of 2 haplotypes in disease severity. *J Rheumatol*. 2010;37(5):987-92.
35. Vosslander S, van der Voort LF, van den Elskamp IJ, Heijmans R, Aubin C, Uitdehaag BM, et al. Interferon regulatory factor 5 gene variants and pharmacological and clinical outcome of Interferonbeta therapy in multiple sclerosis. *Genes Immun*. 2011;12(6):466-72.
36. Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, Robins P, Leitch A, Ali M, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutieres syndrome at the AGS1 locus. *Nat Genet*. 2006;38(8):917-20.
37. Pisetsky DS. The role of innate immunity in the induction of autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2008;8(1):69-72.
38. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008;455(7216):1109-13.
39. Irwin KK, Renzette N, Kowalik TF, Jensen JD. Antiviral drug resistance as an adaptive process. *Virus Evol*. 2016;2(1):vew014.
40. Metcalf CJE, Lessler J. Opportunities and challenges in modeling emerging infectious diseases. *Science*. 2017;357(6347):149-52.
41. Es-Saad S, Tremblay N, Baril M, Lamarre D. Regulators of innate immunity as novel targets for panviral therapeutics. *Curr Opin Virol*. 2012;2(5):622-8.
42. Zhang X, Kraft A, Broering R, Schlaak JF, Dittmer U, Lu M. Preclinical development of TLR ligands as drugs for the treatment of chronic viral infections. *Expert Opin Drug Discov*. 2012;7(7):597-611.
43. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 2011;30(1):16-34.
44. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 2006;442(7098):39-44.
45. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 2006;7(2):131-7.
46. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(4):432-6.

47. Touzot M, Soumelis V, Asselah T. A dive into the complexity of type I interferon antiviral functions. *J Hepatol.* 2012;56(3):726-8.
48. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):778-809, table of contents.
49. Vilcek J. Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity.* 2006;25(3):343-8.
50. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957;147(927):258-67.
51. Nagano Y, Kojima Y. [Inhibition of vaccinia infection by a liquid factor in tissues infected by homologous virus]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1958;152(11):1627-9. Inhibition de l'infection vaccinale par un facteur liquide dans le tissu infecte par le virus homologue.
52. Wheelock EF. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science.* 1965;149(3681):310-1.
53. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol.* 2003;4(1):69-77.
54. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol.* 2003;4(1):63-8.
55. Chen J, Baig E, Fish EN. Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res.* 2004;24(12):687-98.
56. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004;202:8-32.
57. Kotenko SV, Durbin JE. Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location. *J Biol Chem.* 2017;292(18):7295-303.
58. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet.* 2013;45(2):164-71.
59. Cantin E, Tanamachi B, Openshaw H. Role for gamma interferon in control of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Virol.* 1999;73(4):3418-23.
60. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, et al. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science.* 1993;259(5102):1742-5.
61. Lu B, Ebensperger C, Dembic Z, Wang Y, Kvatyuk M, Lu T, et al. Targeted disruption of the interferon-gamma receptor 2 gene results in severe immune defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):8233-8.



62. Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*. 1994;264(5167):1918-21.
63. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol*. 1998;161(7):3400-7.
64. Tukamura M. [Cultivation of tubercle bacilli on egg media by use of spiral loop inoculation. Comparison of media]. *Kekkaku*. 1962;37:278-82.
65. Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9(2):117-23.
66. Vindhya PK, Sheets JH. Bilateral block with unilateral peribulbar block. *Ophthalmic Surg*. 1992;23(1):69.
67. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571-611.
68. Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol*. 1998;16(3-4):365-96.
69. Borges da Silva H, Fonseca R, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. IFN-gamma Priming Effects on the Maintenance of Effector Memory CD4(+) T Cells and on Phagocyte Function: Evidences from Infectious Diseases. *J Immunol Res*. 2015;2015:202816.
70. Hu X, Herrero C, Li WP, Antoniv TT, Falck-Pedersen E, Koch AE, et al. Sensitization of IFN-gamma Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat Immunol*. 2002;3(9):859-66.
71. Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*. 2009;31(4):539-50.
72. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:727-77.
73. Pestka S, Kelder B, Familletti PC, Moschera JA, Crowl R, Kempner ES. Molecular weight of the functional unit of human leukocyte, fibroblast, and immune interferons. *J Biol Chem*. 1983;258(16):9706-9.
74. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999;284(5421):1835-7.
75. Foster GR, Germain C, Jones M, Lechler RI, Lombardi G. Human T cells elicit IFN-alpha secretion from dendritic cells following cell to cell interactions. *Eur J Immunol*. 2000;30(11):3228-35.

76. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol.* 2002;169(8):4279-87.
77. Lee CK, Rao DT, Gertner R, Gimeno R, Frey AB, Levy DE. Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol.* 2000;165(7):3571-7.
78. Hervas-Stubbs S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, Melero I. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res.* 2011;17(9):2619-27.
79. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity.* 2006;25(3):373-81.
80. Schmeisser H, Bekisz J, Zoon KC. New function of type I IFN: induction of autophagy. *J Interferon Cytokine Res.* 2014;34(2):71-8.
81. Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res.* 2010;30(8):555-64.
82. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.* 2008;4(3):e1000017.
83. Zhou Z, Hamming OJ, Ank N, Paludan SR, Nielsen AL, Hartmann R. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol.* 2007;81(14):7749-58.
84. Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, Falcone V, et al. Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *J Virol.* 2010;84(11):5670-7.
85. Pott J, Mahlakoiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, Stockinger S, et al. IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(19):7944-9.
86. Okabayashi T, Kojima T, Masaki T, Yokota S, Imaizumi T, Tsutsumi H, et al. Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Res.* 2011;160(1-2):360-6.
87. Lee-Kirsch MA, Wolf C, Kretschmer S, Roers A. Type I interferonopathies--an expanding disease spectrum of immunodysregulation. *Semin Immunopathol.* 2015;37(4):349-57.
88. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology.* 2001;19:623-55.
89. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:227-64.

90. Maniatis T, Falvo JV, Kim TH, Kim TK, Lin CH, Parekh BS, et al. Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1998;63:609-20.
91. Panne D. The enhanceosome. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18(2):236-42.
92. Falvo JV, Parekh BS, Lin CH, Fraenkel E, Maniatis T. Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation. *Mol Cell Biol.* 2000;20(13):4814-25.
93. Escalante CR, Shen L, Thanos D, Aggarwal AK. Structure of NF-kappaB p50/p65 heterodimer bound to the PRDII DNA element from the interferon-beta promoter. *Structure.* 2002;10(3):383-91.
94. Panne D, Maniatis T, Harrison SC. Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon-beta enhancer. *EMBO J.* 2004;23(22):4384-93.
95. Escalante CR, Nistal-Villan E, Shen L, Garcia-Sastre A, Aggarwal AK. Structure of IRF-3 bound to the PRDIII-I regulatory element of the human interferon-beta enhancer. *Mol Cell.* 2007;26(5):703-16.
96. Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 2001;15(18):2321-42.
97. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006;25(51):6680-4.
98. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4(5):491-6.
99. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science.* 2003;300(5622):1148-51.
100. Paun A, Pitha PM. The IRF family, revisited. *Biochimie.* 2007;89(6-7):744-53.
101. Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, et al. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity.* 1999;11(6):721-31.
102. Iordanov MS, Paranjape JM, Zhou A, Wong J, Williams BR, Meurs EF, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol Cell Biol.* 2000;20(2):617-27.
103. Adamson AL, Darr D, Holley-Guthrie E, Johnson RA, Mauser A, Swenson J, et al. Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J Virol.* 2000;74(3):1224-33.

104. Kim T, Kim TY, Lee WG, Yim J, Kim TK. Signaling pathways to the assembly of an interferon-beta enhanceosome. Chemical genetic studies with a small molecule. *J Biol Chem*. 2000;275(22):16910-7.
105. Falvo JV, Thanos D, Maniatis T. Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell*. 1995;83(7):1101-11.
106. Thanos D, Maniatis T. The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell*. 1992;71(5):777-89.
107. Yie J, Liang S, Merika M, Thanos D. Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol Cell Biol*. 1997;17(7):3649-62.
108. Agaloti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*. 2000;103(4):667-78.
109. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996;87(5):953-9.
110. Ford E, Thanos D. The transcriptional code of human IFN-beta gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(3-4):328-36.
111. Levy DE, Marie IJ, Durbin JE. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol*. 2011;1(6):476-86.
112. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*. 2000;13(4):539-48.
113. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:535-84.
114. Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol*. 2005;17(11):1367-78.
115. Colamonici O, Yan H, Domanski P, Handa R, Smalley D, Mullersman J, et al. Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 1994;14(12):8133-42.
116. Colamonici OR, Uyttendaele H, Domanski P, Yan H, Krolewski JJ. p135tyk2, an interferon-alpha-activated tyrosine kinase, is physically associated with an interferon-alpha receptor. *J Biol Chem*. 1994;269(5):3518-22.
117. Gauzzi MC, Velazquez L, McKendry R, Mogensen KE, Fellous M, Pellegrini S. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem*. 1996;271(34):20494-500.

118. Krishnan K, Yan H, Lim JT, Krolewski JJ. Dimerization of a chimeric CD4-interferon-alpha receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation. *Oncogene*. 1996;13(1):125-33.
119. Yan H, Krishnan K, Greenlund AC, Gupta S, Lim JT, Schreiber RD, et al. Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFNaR1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J*. 1996;15(5):1064-74.
120. Li X, Leung S, Kerr IM, Stark GR. Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol Cell Biol*. 1997;17(4):2048-56.
121. Tang X, Gao JS, Guan YJ, McLane KE, Yuan ZL, Ramratnam B, et al. Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell*. 2007;131(1):93-105.
122. Au-Yeung N, Mandhana R, Horvath CM. Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. *JAKSTAT*. 2013;2(3):e23931.
123. van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*. 2006;25(3):361-72.
124. Rani MR, Ransohoff RM. Alternative and accessory pathways in the regulation of IFN-beta-mediated gene expression. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25(12):788-98.
125. Kanno Y, Levi BZ, Tamura T, Ozato K. Immune cell-specific amplification of interferon signaling by the IRF-4/8-PU.1 complex. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25(12):770-9.
126. Sanceau J, Hiscott J, Delattre O, Wietzerbin J. IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene*. 2000;19(30):3372-83.
127. Gamero AM, Potla R, Wegrzyn J, Szelag M, Edling AE, Shimoda K, et al. Activation of Tyk2 and Stat3 is required for the apoptotic actions of interferon-beta in primary pro-B cells. *J Biol Chem*. 2006;281(24):16238-44.
128. Barca O, Ferre S, Seoane M, Prieto JM, Lema M, Senaris R, et al. Interferon beta promotes survival in primary astrocytes through phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neuroimmunol*. 2003;139(1-2):155-9.
129. Thyrell L, Hjortsberg L, Arulampalam V, Panaretakis T, Uhles S, Dagnell M, et al. Interferon alpha-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem*. 2004;279(23):24152-62.
130. Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie*. 2007;89(6-7):884-93.

131. Moschos S, Kirkwood JM. Present role and future potential of type I interferons in adjuvant therapy of high-risk operable melanoma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18(5-6):451-8.
132. Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, et al. Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *Journal of virology.* 2002;76(11):5532-9.
133. Andersen J, VanScoy S, Cheng TF, Gomez D, Reich NC. IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. *Genes Immun.* 2008;9(2):168-75.
134. Nakaya T, Sato M, Hata N, Asagiri M, Suemori H, Noguchi S, et al. Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochemical and biophysical research communications.* 2001;283(5):1150-6.
135. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature.* 2011;472(7344):481-5.
136. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol.* 2011;1(6):519-25.
137. Grandvaux N, tenOever BR, Servant MJ, Hiscott J. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15(3):259-67.
138. Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):559-68.
139. Wang W, Xu L, Su J, Peppelenbosch MP, Pan Q. Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes. *Trends Microbiol.* 2017;25(7):573-84.
140. Korant BD, Blomstrom DC, Jonak GJ, Knight E, Jr. Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon. *J Biol Chem.* 1984;259(23):14835-9.
141. Haas AL, Ahrens P, Bright PM, Ankel H. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J Biol Chem.* 1987;262(23):11315-23.
142. Lenschow DJ, Giannakopoulos NV, Gunn LJ, Johnston C, O'Guin AK, Schmidt RE, et al. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. *J Virol.* 2005;79(22):13974-83.
143. Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, Wolff T, et al. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(4):1371-6.
144. Morales DJ, Lenschow DJ. The antiviral activities of ISG15. *J Mol Biol.* 2013;425(24):4995-5008.

145. Zou W, Zhang DE. The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. *J Biol Chem.* 2006;281(7):3989-94.
146. Wong JJ, Pung YF, Sze NS, Chin KC. HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(28):10735-40.
147. Durfee LA, Lyon N, Seo K, Huijbregtse JM. The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Mol Cell.* 2010;38(5):722-32.
148. Tang Y, Zhong G, Zhu L, Liu X, Shan Y, Feng H, et al. Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *J Immunol.* 2010;184(10):5777-90.
149. Zhao C, Hsiang TY, Kuo RL, Krug RM. ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):2253-8.
150. Woods MW, Kelly JN, Hattlmann CJ, Tong JG, Xu LS, Coleman MD, et al. Human HERC5 restricts an early stage of HIV-1 assembly by a mechanism correlating with the ISGylation of Gag. *Retrovirology.* 2011;8:95.
151. Shi HX, Yang K, Liu X, Liu XY, Wei B, Shan YF, et al. Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Mol Cell Biol.* 2010;30(10):2424-36.
152. Lu G, Reinert JT, Pitha-Rowe I, Okumura A, Kellum M, Knobloch KP, et al. ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2006;52(1):29-41.
153. Okumura F, Okumura AJ, Uematsu K, Hatakeyama S, Zhang DE, Kamura T. Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by interferon-stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. *J Biol Chem.* 2013;288(4):2839-47.
154. D'Cunha J, Ramanujam S, Wagner RJ, Witt PL, Knight E, Jr., Borden EC. In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. *J Immunol.* 1996;157(9):4100-8.
155. D'Cunha J, Knight E, Jr., Haas AL, Truitt RL, Borden EC. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(1):211-5.
156. Guo J, Hui DJ, Merrick WC, Sen GC. A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *EMBO J.* 2000;19(24):6891-9.
157. Hui DJ, Bhasker CR, Merrick WC, Sen GC. Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNAi. *J Biol Chem.* 2003;278(41):39477-82.

158. Terenzi F, Hui DJ, Merrick WC, Sen GC. Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56. *J Biol Chem.* 2006;281(45):34064-71.
159. Fensterl V, Sen GC. The ISG56/IFIT1 gene family. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):71-8.
160. Wang X, Hinson ER, Cresswell P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe.* 2007;2(2):96-105.
161. Fitzgerald KA. The interferon inducible gene: Viperin. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):131-5.
162. Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol.* 2010;20(1):4-22.
163. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996;86(6):973-83.
164. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol.* 2007;19(1):24-32.
165. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, et al. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics.* 2007;8:124.
166. Gao D, Li W. Structures and recognition modes of toll-like receptors. *Proteins.* 2017;85(1):3-9.
167. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science.* 2005;309(5734):581-5.
168. Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, et al. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science.* 2008;320(5874):379-81.
169. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413(6857):732-8.
170. Rudd BD, Smit JJ, Flavell RA, Alexopoulou L, Schaller MA, Gruber A, et al. Deletion of TLR3 alters the pulmonary immune environment and mucus production during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 2006;176(3):1937-42.
171. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 2004;10(12):1366-73.
172. Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, Alexopoulou L, Escriou N, Flavell R, et al. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog.* 2006;2(6):e53.



173. Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*. 2007;317(5844):1522-7.
174. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*. 2003;4(2):161-7.
175. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003;301(5633):640-3.
176. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2002;169(12):6668-72.
177. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):353-64.
178. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2003;171(8):4304-10.
179. Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem*. 2005;280(44):36560-6.
180. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*. 2007;26(22):3214-26.
181. Chen F, Bhatia D, Chang Q, Castranova V. Finding NEMO by K63-linked polyubiquitin chain. *Cell Death Differ*. 2006;13(11):1835-8.
182. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, et al. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1087-95.
183. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 2001;412(6844):346-51.
184. Lee SW, Han SI, Kim HH, Lee ZH. TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF-kappaB. *J Biochem Mol Biol*. 2002;35(4):371-6.
185. Hacker H, Redecke V, Blagojev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*. 2006;439(7073):204-7.

186. Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, Giese T, Schnurr M, Endres S, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol.* 2005;174(7):4043-50.
187. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002;168(9):4531-7.
188. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol.* 2002;3(6):499.
189. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med.* 2002;195(11):1507-12.
190. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004;303(5663):1526-9.
191. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* 2004;303(5663):1529-31.
192. Melchjorsen J, Jensen SB, Malmgaard L, Rasmussen SB, Weber F, Bowie AG, et al. Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J Virol.* 2005;79(20):12944-51.
193. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(15):5598-603.
194. Triantafyllou K, Orthopoulos G, Vakakis E, Ahmed MA, Golenbock DT, Lepper PM, et al. Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. *Cell Microbiol.* 2005;7(8):1117-26.
195. Wang JP, Liu P, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW, Libraty DH. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol.* 2006;177(10):7114-21.
196. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408(6813):740-5.
197. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood.* 2004;103(4):1433-7.

198. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;198(3):513-20.
199. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1219-26.
200. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*. 2004;5(10):1061-8.
201. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*. 2006;439(7073):208-11.
202. Hoshino K, Sugiyama T, Matsumoto M, Tanaka T, Saito M, Hemmi H, et al. I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature*. 2006;440(7086):949-53.
203. Yang K, Puel A, Zhang S, Eidenschenk C, Ku CL, Casrouge A, et al. Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity*. 2005;23(5):465-78.
204. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotani T, Kato H, Takeshita F, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *J Exp Med*. 2005;201(6):915-23.
205. Kawagoe T, Sato S, Jung A, Yamamoto M, Matsui K, Kato H, et al. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *J Exp Med*. 2007;204(5):1013-24.
206. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, et al. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol*. 2008;9(6):684-91.
207. Gohda J, Matsumura T, Inoue J. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol*. 2004;173(5):2913-7.
208. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15416-21.
209. Cao W, Manicassamy S, Tang H, Kasturi SP, Pirani A, Murthy N, et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol*. 2008;9(10):1157-64.

210. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1143:1-20.
211. Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyler KL, Flavell RA, Oldstone MB. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology.* 2004;322(2):231-8.
212. Lopez CB, Moltedo B, Alexopoulou L, Bonifaz L, Flavell RA, Moran TM. TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses. *J Immunol.* 2004;173(11):6882-9.
213. Hornung V, Schlender J, Guenther-Biller M, Rothenfusser S, Endres S, Conzelmann KK, et al. Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol.* 2004;173(10):5935-43.
214. Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev.* 2009;227(1):54-65.
215. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol.* 2005;175(5):2851-8.
216. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* 2005;23(1):19-28.
217. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006;441(7089):101-5.
218. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology.* 2004;5(7):730-7.
219. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med.* 2008;205(7):1601-10.
220. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(22):8459-64.
221. Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *Journal of virology.* 2008;82(1):335-45.
222. Zhou S, Cerny AM, Zacharia A, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Induction and inhibition of type I interferon responses by distinct components of lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology.* 2010;84(18):9452-62.

223. Parisien JP, Bamming D, Komuro A, Ramachandran A, Rodriguez JJ, Barber G, et al. A shared interface mediates paramyxovirus interference with antiviral RNA helicases MDA5 and LGP2. *Journal of virology*. 2009;83(14):7252-60.
224. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, et al. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(49):17264-9.
225. Barral PM, Sarkar D, Fisher PB, Racaniello VR. RIG-I is cleaved during picornavirus infection. *Virology*. 2009;391(2):171-6.
226. Errett JS, Gale M. Emerging complexity and new roles for the RIG-I-like receptors in innate antiviral immunity. *Virol Sin*. 2015;30(3):163-73.
227. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 2006;314(5801):994-7.
228. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006;314(5801):997-1001.
229. Habjan M, Andersson I, Klingstrom J, Schumann M, Martin A, Zimmermann P, et al. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One*. 2008;3(4):e2032.
230. Mathias K, Spillner G, Staiger J, Ahmadi A, Werner JP. [Percutaneous transluminal revascularization of lower-leg arteries]. *Chirurg*. 1979;50(3):158-63. Percutane transluminale Revascularisation von Unterschenkelarterien.
231. Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, et al. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(2):582-7.
232. Kang DC, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(2):637-42.
233. Vitour D, Meurs EF. Regulation of interferon production by RIG-I and LGP2: a lesson in self-control. *Sci STKE*. 2007;2007(384):pe20.
234. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, et al. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(4):1512-7.
235. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, et al. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol*. 2005;175(8):5260-8.

236. Eisenacher K, Krug A. Regulation of RLR-mediated innate immune signaling--it is all about keeping the balance. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(1):36-47.
237. Komuro A, Horvath CM. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol.* 2006;80(24):12332-42.
238. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology.* 2005;6(10):981-8.
239. Kumar H, Kawai T, Kato H, Sato S, Takahashi K, Coban C, et al. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med.* 2006;203(7):1795-803.
240. Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, Forman J, et al. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity.* 2006;24(5):633-42.
241. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell.* 2005;122(5):669-82.
242. Belgnaoui SM, Paz S, Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):564-72.
243. Kolakofsky D, Kowalinski E, Cusack S. A structure-based model of RIG-I activation. *RNA.* 2012;18(12):2118-27.
244. Nistal-Villan E, Gack MU, Martinez-Delgado G, Maharaj NP, Inn KS, Yang H, et al. Negative role of RIG-I serine 8 phosphorylation in the regulation of interferon-beta production. *J Biol Chem.* 2010;285(26):20252-61.
245. Maharaj NP, Wies E, Stoll A, Gack MU. Conventional protein kinase C-alpha (PKC-alpha) and PKC-beta negatively regulate RIG-I antiviral signal transduction. *J Virol.* 2012;86(3):1358-71.
246. Wies E, Wang MK, Maharaj NP, Chen K, Zhou S, Finberg RW, et al. Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity.* 2013;38(3):437-49.
247. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature.* 2007;446(7138):916-20.
248. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell host & microbe.* 2010;8(6):496-509.
249. Jiang X, Kinch LN, Brautigam CA, Chen X, Du F, Grishin NV, et al. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity.* 2012;36(6):959-73.

250. Peisley A, Wu B, Xu H, Chen ZJ, Hur S. Structural basis for ubiquitin-mediated antiviral signal activation by RIG-I. *Nature*. 2014;509(7498):110-4.
251. Shi Y, Yuan B, Zhu W, Zhang R, Li L, Hao X, et al. Ube2D3 and Ube2N are essential for RIG-I-mediated MAVS aggregation in antiviral innate immunity. *Nat Commun*. 2017;8:15138.
252. Peisley A, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Liu M, Walz T, et al. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(52):21010-5.
253. Berke IC, Yu X, Modis Y, Egelman EH. MDA5 assembles into a polar helical filament on dsRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(45):18437-41.
254. Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, et al. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell*. 2013;152(1-2):276-89.
255. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 2005;437(7062):1167-72.
256. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*. 2005;19(6):727-40.
257. Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, Shum B, et al. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell*. 2010;141(4):668-81.
258. Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M, Jr. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(35):14590-5.
259. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 2011;146(3):448-61.
260. Cai X, Chen ZJ. Prion-like polymerization as a signaling mechanism. *Trends Immunol*. 2014;35(12):622-30.
261. Cai X, Xu H, Chen ZJ. Prion-Like Polymerization in Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(4).
262. Mikkelsen SS, Jensen SB, Chiliveru S, Melchjorsen J, Julkunen I, Gaestel M, et al. RIG-I-mediated activation of p38 MAPK is essential for viral induction of interferon and activation of dendritic cells: dependence on TRAF2 and TAK1. *J Biol Chem*. 2009;284(16):10774-82.
263. Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, Okamoto F, Yoshioka T, Choi Y, et al. TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem*. 2008;283(52):36211-20.

264. Shi Z, Zhang Z, Zhang Z, Wang Y, Li C, Wang X, et al. Structural Insights into mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS)-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) signaling. *J Biol Chem.* 2015;290(44):26811-20.
265. Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity.* 2011;34(5):680-92.
266. Maelfait J, Beyaert R. Emerging role of ubiquitination in antiviral RIG-I signaling. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(1):33-45.
267. Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, et al. The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nature immunology.* 2007;8(6):592-600.
268. Ryzhakov G, Randow F. SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *EMBO J.* 2007;26(13):3180-90.
269. Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, et al. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J.* 2006;25(14):3257-63.
270. Paz S, Vilasco M, Werden SJ, Arguello M, Joseph-Pillai D, Zhao T, et al. A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response. *Cell research.* 2011;21(6):895-910.
271. Zhang P, Reichardt A, Liang H, Aliyari R, Cheng D, Wang Y, et al. Single amino acid substitutions confer the antiviral activity of the TRAF3 adaptor protein onto TRAF5. *Sci Signal.* 2012;5(250):ra81.
272. Fang R, Jiang Q, Zhou X, Wang C, Guan Y, Tao J, et al. MAVS activates TBK1 and IKKepsilon through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLoS pathogens.* 2017;13(11):e1006720.
273. Chau TL, Gioia R, Gatot JS, Patrascu F, Carpentier I, Chapelle JP, et al. Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated? *Trends Biochem Sci.* 2008;33(4):171-80.
274. Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA, Vazquez J, Rebsamen M, Curran J, et al. TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity.* 2008;28(5):651-61.
275. Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, Akira S. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol.* 2006;176(8):4520-4.
276. Sun W, Li Y, Chen L, Chen H, You F, Zhou X, et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8653-8.
277. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature.* 2009;461(7265):788-92.



278. Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*. 2008;29(4):538-50.
279. Jin L, Waterman PM, Jonscher KR, Short CM, Reisdorph NA, Cambier JC. MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(16):5014-26.
280. Zeng W, Chen ZJ. MITA gating viral infection. *Immunity*. 2008;29(4):513-5.
281. Abe T, Harashima A, Xia T, Konno H, Konno K, Morales A, et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell*. 2013;50(1):5-15.
282. Surpris G, Poltorak A. The expanding regulatory network of STING-mediated signaling. *Curr Opin Microbiol*. 2016;32:144-50.
283. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194(6):863-9.
284. Song L, Fujimoto BS, Wu PG, Thomas JC, Shibata JH, Schurr JM. Evidence for allosteric transitions in secondary structure induced by superhelical stress. *J Mol Biol*. 1990;214(1):307-26.
285. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009;458(7237):509-13.
286. Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe*. 2012;11(5):469-80.
287. Sharma S, DeOliveira RB, Kalantari P, Parroche P, Goutagny N, Jiang Z, et al. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the Plasmodium falciparum genome. *Immunity*. 2011;35(2):194-207.
288. Okabe Y, Kawane K, Akira S, Taniguchi T, Nagata S. Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J Exp Med*. 2005;202(10):1333-9.
289. Yang YG, Lindahl T, Barnes DE. Tbx1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell*. 2007;131(5):873-86.
290. Stetson DB, Ko JS, Heidmann T, Medzhitov R. Tbx1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*. 2008;134(4):587-98.
291. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*. 2007;448(7152):501-5.

292. Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, et al. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(14):5477-82.
293. DeFilippis VR, Alvarado D, Sali T, Rothenburg S, Fruh K. Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1. *J Virol*. 2010;84(1):585-98.
294. Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, et al. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*. 2008;451(7179):725-9.
295. Lippmann J, Rothenburg S, Deigendesch N, Eitel J, Meixenberger K, van Laak V, et al. IFNbeta responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol*. 2008;10(12):2579-88.
296. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*. 2009;138(3):576-91.
297. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol*. 2009;10(10):1065-72.
298. Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F, et al. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol*. 2006;7(1):40-8.
299. Paludan SR, Bowie AG. Immune sensing of DNA. *Immunity*. 2013;38(5):870-80.
300. Dempsey A, Bowie AG. Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology*. 2015;479-480:146-52.
301. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*. 2008;455(7213):674-8.
302. Tanaka Y, Chen ZJ. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal*. 2012;5(214):ra20.
303. Chen X, Yang X, Zheng Y, Yang Y, Xing Y, Chen Z. SARS coronavirus papain-like protease inhibits the type I interferon signaling pathway through interaction with the STING-TRAF3-TBK1 complex. *Protein Cell*. 2014;5(5):369-81.
304. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*. 2011;478(7370):515-8.
305. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*. 2013;339(6121):826-30.

306. Davies BW, Bogard RW, Young TS, Mekalanos JJ. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell*. 2012;149(2):358-70.
307. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 2013;339(6121):786-91.
308. Li XD, Wu J, Gao D, Wang H, Sun L, Chen ZJ. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science*. 2013;341(6152):1390-4.
309. Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, Gainey MD, Shrestha B, Eitson JL, et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature*. 2014;505(7485):691-5.
310. Gao D, Wu J, Wu YT, Du F, Aroh C, Yan N, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science*. 2013;341(6148):903-6.
311. Jonsson KL, Laustsen A, Krapp C, Skipper KA, Thavachelvam K, Hotter D, et al. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. *Nat Commun*. 2017;8:14391.
312. Almine JF, O'Hare CA, Dunphy G, Haga IR, Naik RJ, Atrih A, et al. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nat Commun*. 2017;8:14392.
313. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(8):535-42.
314. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:257-90.
315. Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, et al. The *Unc93b1* mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol*. 2006;7(2):156-64.
316. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol*. 2007;177(2):265-75.
317. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. 2008;452(7184):234-8.
318. Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M, Barton GM. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med*. 2011;208(4):643-51.
319. Lee BL, Barton GM. Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol*. 2014;24(6):360-9.

320. Kagan JC. Signaling organelles of the innate immune system. *Cell*. 2012;151(6):1168-78.
321. Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science*. 2010;329(5998):1530-4.
322. Orzalli MH, DeLuca NA, Knipe DM. Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(44):E3008-17.
323. Li T, Diner BA, Chen J, Cristea IM. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(26):10558-63.
324. Liu HM, Loo YM, Horner SM, Zornetzer GA, Katze MG, Gale M, Jr. The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3epsilon regulates a RIG-I translocon that mediates membrane association and innate antiviral immunity. *Cell host & microbe*. 2012;11(5):528-37.
325. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461.
326. Horner SM, Wilkins C, Badil S, Iskarpatyoti J, Gale M, Jr. Proteomic analysis of mitochondrial-associated ER membranes (MAM) during RNA virus infection reveals dynamic changes in protein and organelle trafficking. *PLoS One*. 2015;10(3):e0117963.
327. Odendall C, Dixit E, Stavru F, Bierne H, Franz KM, Durbin AF, et al. Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol*. 2014;15(8):717-26.
328. Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, et al. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(15):6001-6.
329. Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*. 2001;20(44):6482-91.
330. Parvatiyar K, Barber GN, Harhaj EW. TAX1BP1 and A20 inhibit antiviral signaling by targeting TBK1-IKKi kinases. *J Biol Chem*. 2010;285(20):14999-5009.
331. Li S, Wang L, Berman M, Kong YY, Dorf ME. Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. *Immunity*. 2011;35(3):426-40.
332. Ma X, Helgason E, Phung QT, Quan CL, Iyer RS, Lee MW, et al. Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(24):9378-83.
333. Hiscott J, Grandvaux N, Sharma S, Tenoever BR, Servant MJ, Lin R. Convergence of the NF-kappaB and interferon signaling pathways in the

- regulation of antiviral defense and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:237-48.
334. Saha SK, Cheng G. TRAF3: a new regulator of type I interferons. *Cell cycle.* 2006;5(8):804-7.
335. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(49):20842-6.
336. Barber GN. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends Immunol.* 2014;35(2):88-93.
337. Dobbs N, Burnaevskiy N, Chen D, Gonugunta VK, Alto NM, Yan N. STING Activation by Translocation from the ER Is Associated with Infection and Autoinflammatory Disease. *Cell host & microbe.* 2015;18(2):157-68.
338. Hiller B, Hornung V. STING Signaling the enERGIC Way. *Cell host & microbe.* 2015;18(2):137-9.
339. Burnaevskiy N, Fox TG, Plymire DA, Ertelt JM, Weigle BA, Selyunin AS, et al. Proteolytic elimination of N-myristoyl modifications by the Shigella virulence factor IpaJ. *Nature.* 2013;496(7443):106-9.
340. van Zuylen WJ, Doyon P, Clement JF, Khan KA, D'Ambrosio LM, Do F, et al. Proteomic profiling of the TRAF3 interactome network reveals a new role for the ER-to-Golgi transport compartments in innate immunity. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):e1002747.
341. Watson P, Townley AK, Koka P, Palmer KJ, Stephens DJ. Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic.* 2006;7(12):1678-87.
342. Bhattacharyya D, Glick BS. Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Mol Biol Cell.* 2007;18(3):839-49.
343. Iinuma T, Shiga A, Nakamoto K, O'Brien MB, Aridor M, Arimitsu N, et al. Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(24):17632-9.
344. Allan BB, Moyer BD, Balch WE. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science.* 2000;289(5478):444-8.
345. Alvarez C, Fujita H, Hubbard A, Sztul E. ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *J Cell Biol.* 1999;147(6):1205-22.
346. Beard M, Satoh A, Shorter J, Warren G. A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem.* 2005;280(27):25840-8.

347. Sonnichsen B, Lowe M, Levine T, Jamsa E, Dirac-Svejstrup B, Warren G. A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol.* 1998;140(5):1013-21.
348. Greco A, Fusetti L, Miranda C, Villa R, Zanotti S, Pagliardini S, et al. Role of the TFG N-terminus and coiled-coil domain in the transforming activity of the thyroid TRK-T3 oncogene. *Oncogene.* 1998;16(6):809-16.
349. Mencinger M, Panagopoulos I, Andreasson P, Lassen C, Mitelman F, Aman P. Characterization and chromosomal mapping of the human TFG gene involved in thyroid carcinoma. *Genomics.* 1997;41(3):327-31.
350. Miranda C, Roccato E, Raho G, Pagliardini S, Pierotti MA, Greco A. The TFG protein, involved in oncogenic rearrangements, interacts with TANK and NEMO, two proteins involved in the NF-kappaB pathway. *Journal of cellular physiology.* 2006;208(1):154-60.
351. Ohan N, Sabourin D, Booth RA, Liu XJ. *Xenopus laevis* TRK-fused gene (TFG) is an SH3 domain binding protein highly expressed in the cement gland. *Mol Reprod Dev.* 2000;56(3):336-44.
352. Roccato E, Miranda C, Raho G, Pagliardini S, Pierotti MA, Greco A. Analysis of SHP-1-mediated down-regulation of the TRK-T3 oncoprotein identifies Trk-fused gene (TFG) as a novel SHP-1-interacting protein. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(5):3382-9.
353. Roccato E, Pagliardini S, Cleris L, Canevari S, Formelli F, Pierotti MA, et al. Role of TFG sequences outside the coiled-coil domain in TRK-T3 oncogenic activation. *Oncogene.* 2003;22(6):807-18.
354. Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M, et al. The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. *Molecular and cellular biology.* 1995;15(11):6118-27.
355. Hernandez L, Pinyol M, Hernandez S, Bea S, Pulford K, Rosenwald A, et al. TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood.* 1999;94(9):3265-8.
356. Hernandez L, Bea S, Bellosillo B, Pinyol M, Falini B, Carbone A, et al. Diversity of genomic breakpoints in TFG-ALK translocations in anaplastic large cell lymphomas: identification of a new TFG-ALK(XL) chimeric gene with transforming activity. *Am J Pathol.* 2002;160(4):1487-94.
357. Hisaoka M, Ishida T, Imamura T, Hashimoto H. TFG is a novel fusion partner of NOR1 in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;40(4):325-8.
358. Chen Y, Tseng SH. Targeting tropomyosin-receptor kinase fused gene in cancer. *Anticancer Res.* 2014;34(4):1595-600.

359. Zanetti G, Pahuja KB, Studer S, Shim S, Schekman R. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat Cell Biol.* 2011;14(1):20-8.
360. Brandizzi F, Barlowe C. Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(6):382-92.
361. Zanetti G, Prinz S, Daum S, Meister A, Schekman R, Bacia K, et al. The structure of the COPII transport-vesicle coat assembled on membranes. *Elife.* 2013;2:e00951.
362. Barlowe C, Schekman R. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature.* 1993;365(6444):347-9.
363. Antonny B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol.* 2001;3(6):531-7.
364. Lee MC, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell.* 2005;122(4):605-17.
365. Miller E, Antonny B, Hamamoto S, Schekman R. Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J.* 2002;21(22):6105-13.
366. Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MC, Hamamoto S, Orci L, et al. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell.* 2003;114(4):497-509.
367. Bi X, Mancias JD, Goldberg J. Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23.Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Dev Cell.* 2007;13(5):635-45.
368. Stagg SM, Gurkan C, Fowler DM, LaPointe P, Foss TR, Potter CS, et al. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature.* 2006;439(7073):234-8.
369. Bielli A, Haney CJ, Gabreski G, Watkins SC, Bannykh SI, Aridor M. Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *J Cell Biol.* 2005;171(6):919-24.
370. Hughes H, Budnik A, Schmidt K, Palmer KJ, Mantell J, Noakes C, et al. Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *Journal of cell science.* 2009;122(Pt 16):2924-34.
371. Kung LF, Pagant S, Futai E, D'Arcangelo JG, Buchanan R, Dittmar JC, et al. Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *EMBO J.* 2012;31(4):1014-27.
372. Yorimitsu T, Sato K. Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Mol Biol Cell.* 2012;23(15):2930-42.
373. Supek F, Madden DT, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. Sec16p potentiates the action of COPII proteins to bud transport vesicles. *J Cell Biol.* 2002;158(6):1029-38.

374. Witte K, Schuh AL, Hegermann J, Sarkeshik A, Mayers JR, Schwarze K, et al. TFG-1 function in protein secretion and oncogenesis. *Nat Cell Biol.* 2011;13(5):550-8.
375. Johnson A, Bhattacharya N, Hanna M, Pennington JG, Schuh AL, Wang L, et al. TFG clusters COPII-coated transport carriers and promotes early secretory pathway organization. *EMBO J.* 2015;34(6):811-27.
376. Beetz C, Johnson A, Schuh AL, Thakur S, Varga RE, Fothergill T, et al. Inhibition of TFG function causes hereditary axon degeneration by impairing endoplasmic reticulum structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(13):5091-6.
377. Lee SS, Lee HJ, Park JM, Hong YB, Park KD, Yoo JH, et al. Proximal dominant hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominance association with mutation in the TRK-fused gene. *JAMA Neurol.* 2013;70(5):607-15.
378. Tsai PC, Huang YH, Guo YC, Wu HT, Lin KP, Tsai YS, et al. A novel TFG mutation causes Charcot-Marie-Tooth disease type 2 and impairs TFG function. *Neurology.* 2014;83(10):903-12.
379. Yagi T, Ito D, Suzuki N. TFG-Related Neurologic Disorders: New Insights Into Relationships Between Endoplasmic Reticulum and Neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016;75(4):299-305.
380. Amanchy R, Zhong J, Molina H, Chaerkady R, Iwahori A, Kalume DE, et al. Identification of c-Src tyrosine kinase substrates using mass spectrometry and peptide microarrays. *J Proteome Res.* 2008;7(9):3900-10.
381. Lee NR, Shin HB, Kim HI, Choi MS, Inn KS. Negative regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by TRK-fused gene (TFG) protein. *Biochemical and biophysical research communications.* 2013;437(1):168-72.
382. Endoh K, Nishi M, Ishiguro H, Uemura H, Miyagi Y, Aoki I, et al. Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis. *Prostate.* 2012;72(6):626-37.
383. Herlevsen M, Oxford G, Ptak C, Shabanowitz J, Hunt DF, Conaway M, et al. A novel model to identify interaction partners of the PTEN tumor suppressor gene in human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352(2):549-55.
384. Diner BA, Lum KK, Javitt A, Cristea IM. Interactions of the Antiviral Factor Interferon Gamma-Inducible Protein 16 (IFI16) Mediate Immune Signaling and Herpes Simplex Virus-1 Immunosuppression. *Mol Cell Proteomics.* 2015;14(9):2341-56.
385. Gurtler C, Bowie AG. Innate immune detection of microbial nucleic acids. *Trends in microbiology.* 2013;21(8):413-20.



386. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annual review of immunology*. 2011;29:185-214.
387. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology*. 2014;32:513-45.
388. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010;11(5):373-84.
389. Nakhaei P, Genin P, Civas A, Hiscott J. RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection. *Semin Immunol*. 2009;21(4):215-22.
390. Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Current opinion in immunology*. 2015;32:48-53.
391. Kell AM, Gale M, Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*. 2015;479-480:110-21.
392. Iwasaki A. A virological view of innate immune recognition. *Annual review of microbiology*. 2012;66:177-96.
393. Potter JA, Randall RE, Taylor GL. Crystal structure of human IPS-1/MAVS/VISA/Cardif caspase activation recruitment domain. *BMC structural biology*. 2008;8:11.
394. Servant MJ, Grandvaux N, tenOever BR, Duguay D, Lin R, Hiscott J. Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(11):9441-7.
395. Vazquez C, Horner SM. MAVS Coordination of Antiviral Innate Immunity. *J Virol*. 2015;89(14):6974-7.
396. Walsh D, Mathews MB, Mohr I. Tinkering with translation: protein synthesis in virus-infected cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):a012351.
397. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274-93.
398. Ekim B, Magnuson B, Acosta-Jaquez HA, Keller JA, Feener EP, Fingar DC. mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 2011;31(14):2787-801.
399. Gao B, Roux PP. Translational control by oncogenic signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849(7):753-65.
400. Colina R, Costa-Mattioli M, Dowling RJ, Jaramillo M, Tai LH, Breitbach CJ, et al. Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature*. 2008;452(7185):323-8.
401. Uddin S, Yenush L, Sun XJ, Sweet ME, White MF, Plataniias LC. Interferon-alpha engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Biol Chem*. 1995;270(27):15938-41.

402. Uddin S, Fish EN, Sher DA, Gardziola C, White MF, Platanius LC. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase by IFN-alpha. *J Immunol.* 1997;158(5):2390-7.
403. Lekmine F, Uddin S, Sassano A, Parmar S, Brachmann SM, Majchrzak B, et al. Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons. *J Biol Chem.* 2003;278(30):27772-80.
404. Kaur S, Lal L, Sassano A, Majchrzak-Kita B, Srikanth M, Baker DP, et al. Regulatory effects of mammalian target of rapamycin-activated pathways in type I and II interferon signaling. *J Biol Chem.* 2007;282(3):1757-68.
405. Panaretakis T, Hjortsberg L, Tamm KP, Bjorklund AC, Joseph B, Grander D. Interferon alpha induces nucleus-independent apoptosis by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase downstream of phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Mol Biol Cell.* 2008;19(1):41-50.
406. Kaur S, Sassano A, Dolniak B, Joshi S, Majchrzak-Kita B, Baker DP, et al. Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(12):4808-13.
407. Kaur S, Sassano A, Joseph AM, Majchrzak-Kita B, Eklund EA, Verma A, et al. Dual regulatory roles of phosphatidylinositol 3-kinase in IFN signaling. *J Immunol.* 2008;181(10):7316-23.
408. Lekmine F, Sassano A, Uddin S, Smith J, Majchrzak B, Brachmann SM, et al. Interferon-gamma engages the p70 S6 kinase to regulate phosphorylation of the 40S S6 ribosomal protein. *Exp Cell Res.* 2004;295(1):173-82.
409. Burke JD, Sonenberg N, Platanius LC, Fish EN. Antiviral effects of interferon-beta are enhanced in the absence of the translational suppressor 4E-BP1 in myocarditis induced by Coxsackievirus B3. *Antivir Ther.* 2011;16(4):577-84.
410. Khan KA, Do F, Marineau A, Doyon P, Clement JF, Woodgett JR, et al. Fine-Tuning of the RIG-I-Like Receptor/Interferon Regulatory Factor 3-Dependent Antiviral Innate Immune Response by the Glycogen Synthase Kinase 3/beta-Catenin Pathway. *Molecular and cellular biology.* 2015;35(17):3029-43.
411. Shin S, Wolgamott L, Tcherkezian J, Vallabhapurapu S, Yu Y, Roux PP, et al. Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene.* 2014;33(13):1690-9.
412. Ito H, Ichiyangi O, Naito S, Bilim VN, Tomita Y, Kato T, et al. GSK-3 directly regulates phospho-4EBP1 in renal cell carcinoma cell-line: an intrinsic subcellular mechanism for resistance to mTORC1 inhibition. *BMC Cancer.* 2016;16:393.

413. Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*. 2006;314(5798):467-71.
414. Jaramillo M, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N. RNA unwinding in translation: assembly of helicase complex intermediates comprising eukaryotic initiation factors eIF-4F and eIF-4B. *Mol Cell Biol*. 1991;11(12):5992-7.
415. Bi X, Ren J, Goss DJ. Wheat germ translation initiation factor eIF4B affects eIF4A and eIF4E helicase activity by increasing the ATP binding affinity of eIF4A. *Biochemistry*. 2000;39(19):5758-65.
416. Parsyan A, Svitkin Y, Shahbazian D, Gkogkas C, Lasko P, Merrick WC, et al. mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(4):235-45.
417. Kroczyńska B, Kaur S, Katsoulidis E, Majchrzak-Kita B, Sassano A, Kozma SC, et al. Interferon-dependent engagement of eukaryotic initiation factor 4B via S6 kinase (S6K)- and ribosomal protein S6K-mediated signals. *Mol Cell Biol*. 2009;29(10):2865-75.
418. Goke A, Goke R, Knolle A, Trusheim H, Schmidt H, Wilmen A, et al. DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297(1):78-82.
419. Yang HS, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, et al. The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(1):26-37.
420. Kroczyńska B, Sharma B, Eklund EA, Fish EN, Plataniias LC. Regulatory effects of programmed cell death 4 (PDCD4) protein in interferon (IFN)-stimulated gene expression and generation of type I IFN responses. *Mol Cell Biol*. 2012;32(14):2809-22.
421. Costa-Mattioli M, Sonenberg N. RAPPING production of type I interferon in pDCs through mTOR. *Nat Immunol*. 2008;9(10):1097-9.
422. Zhao J, Benakanakere MR, Hosur KB, Galicia JC, Martin M, Kinane DF. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates TLR3 induced cytokines in human oral keratinocytes. *Mol Immunol*. 2010;48(1-3):294-304.
423. Mohr I, Sonenberg N. Host translation at the nexus of infection and immunity. *Cell Host Microbe*. 2012;12(4):470-83.
424. Ohman T, Soderholm S, Paidikondala M, Lietzen N, Matikainen S, Nyman TA. Phosphoproteome characterization reveals that Sendai virus infection activates mTOR signaling in human epithelial cells. *Proteomics*. 2015;15(12):2087-97.
425. Dan HC, Cooper MJ, Cogswell PC, Duncan JA, Ting JP, Baldwin AS. Akt-dependent regulation of NF- $\kappa$ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev*. 2008;22(11):1490-500.

426. Kroczyńska B, Mehrotra S, Arslan AD, Kaur S, Plataniás LC. Regulation of interferon-dependent mRNA translation of target genes. *J Interferon Cytokine Res.* 2014;34(4):289-96.
427. Plataniás LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(5):375-86.
428. Fuse A, Ashino-Fuse H, Kuwata T. Binding of 125I-labeled human interferon to cell lines with low sensitivity to interferon. *Gan.* 1984;75(4):379-84.
429. Balachandran S, Barber GN. Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer cell.* 2004;5(1):51-65.
430. Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, Paterson JM, Power AT, Knowles S, et al. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer cell.* 2003;4(4):263-75.
431. Castanier C, Zemirli N, Portier A, Garcin D, Bidere N, Vazquez A, et al. MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC Biol.* 2012;10:44.
432. Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, et al. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature.* 2002;417(6891):871-5.
433. Zhao KW, Sikriwal D, Dong X, Guo P, Sun X, Dong JT. Oestrogen causes degradation of KLF5 by inducing the E3 ubiquitin ligase EFP in ER-positive breast cancer cells. *The Biochemical journal.* 2011;437(2):323-33.
434. Guo B, Cheng G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem.* 2007;282(16):11817-26.
435. Goncalves A, Burckstummer T, Dixit E, Scheicher R, Gorna MW, Karayel E, et al. Functional dissection of the TBK1 molecular network. *PLoS One.* 2011;6(9):e23971.
436. Wang L, Li S, Dorf ME. NEMO binds ubiquitinated TANK-binding kinase 1 (TBK1) to regulate innate immune responses to RNA viruses. *PLoS One.* 2012;7(9):e43756.
437. Pilli M, Arko-Mensah J, Ponpuak M, Roberts E, Master S, Mandell MA, et al. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity.* 2012;37(2):223-34.
438. Weidberg H, Elazar Z. TBK1 mediates crosstalk between the innate immune response and autophagy. *Science signaling.* 2011;4(187):pe39.
439. Zhao W. Negative regulation of TBK1-mediated antiviral immunity. *FEBS Lett.* 2013;587(6):542-8.
440. Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS. Synovocyte innate immune responses: TANK-binding kinase-1 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2012;51(4):610-8.

441. Kishore N, Huynh QK, Mathialagan S, Hall T, Rouw S, Creely D, et al. IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2: comparative analysis of recombinant human IKK-i, TBK-1, and IKK-2. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(16):13840-7.
442. Soulat D, Burckstummer T, Westermayer S, Goncalves A, Bauch A, Stefanovic A, et al. The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. *The EMBO journal*. 2008;27(15):2135-46.
443. Helgason E, Phung QT, Dueber EC. Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: the emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. *FEBS Lett*. 2013;587(8):1230-7.
444. Tu D, Zhu Z, Zhou AY, Yun CH, Lee KE, Toms AV, et al. Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1. *Cell reports*. 2013;3(3):747-58.
445. McCaughey J, Miller VJ, Stevenson NL, Brown AK, Budnik A, Heesom KJ, et al. TFG Promotes Organization of Transitional ER and Efficient Collagen Secretion. *Cell Rep*. 2016;15(8):1648-59.
446. Sharp TM, Guix S, Katayama K, Crawford SE, Estes MK. Inhibition of cellular protein secretion by norwalk virus nonstructural protein p22 requires a mimic of an endoplasmic reticulum export signal. *PloS one*. 2010;5(10):e13130.
447. Sharp TM, Crawford SE, Ajami NJ, Neill FH, Atmar RL, Katayama K, et al. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology journal*. 2012;9:181.
448. Sharp TM, Estes MK. An inside job: subversion of the host secretory pathway by intestinal pathogens. *Current opinion in infectious diseases*. 2010;23(5):464-9.
449. Yonekawa S, Furuno A, Baba T, Fujiki Y, Ogasawara Y, Yamamoto A, et al. Sec16B is involved in the endoplasmic reticulum export of the peroxisomal membrane biogenesis factor peroxin 16 (Pex16) in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(31):12746-51.
450. Tani K, Tagaya M, Yonekawa S, Baba T. Dual function of Sec16B: Endoplasmic reticulum-derived protein secretion and peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Cell Logist*. 2011;1(4):164-7.
451. Odendall C, Kagan JC. The unique regulation and functions of type III interferons in antiviral immunity. *Curr Opin Virol*. 2015;12:47-52.

452. You J, Hou S, Malik-Soni N, Xu Z, Kumar A, Rachubinski RA, et al. Flavivirus Infection Impairs Peroxisome Biogenesis and Early Antiviral Signaling. *J Virol.* 2015;89(24):12349-61.
453. Wall AA, Luo L, Hung Y, Tong SJ, Condon ND, Blumenthal A, et al. Small GTPase Rab8a-recruited Phosphatidylinositol 3-Kinase gamma Regulates Signaling and Cytokine Outputs from Endosomal Toll-like Receptors. *J Biol Chem.* 2017;292(11):4411-22.
454. Luo L, Wall AA, Yeo JC, Condon ND, Norwood SJ, Schoenwaelder S, et al. Rab8a interacts directly with PI3Kgamma to modulate TLR4-driven PI3K and mTOR signalling. *Nat Commun.* 2014;5:4407.
455. Hrinčius ER, Dierkes R, Anhlan D, Wixler V, Ludwig S, Ehrhardt C. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) is activated by influenza virus vRNA via the pathogen pattern receptor Rig-I to promote efficient type I interferon production. *Cell Microbiol.* 2011;13(12):1907-19.
456. Bodur C, Kazyken D, Huang K, Ekim Ustunel B, Siroky KA, Tooley AS, et al. The IKK-related kinase TBK1 activates mTORC1 directly in response to growth factors and innate immune agonists. *The EMBO journal.* 2018;37(1):19-38.
457. Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimoto M, et al. Interferon-alpha-induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-independent pathway. *J Gastroenterol.* 2009;44(8):856-63.
458. Wang F, Alain T, Szretter KJ, Stephenson K, Pol JG, Atherton MJ, et al. S6K-STING interaction regulates cytosolic DNA-mediated activation of the transcription factor IRF3. *Nat Immunol.* 2016;17(5):514-22.
459. Linke M, Fritsch SD, Sukhbaatar N, Hengstschlager M, Weichhart T. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Lett.* 2017.
460. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(6):596-603.
461. Reiling JH, Sabatini DM. Stress and mTOR signaling. *Oncogene.* 2006;25(48):6373-83.
462. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene.* 2006;25(48):6416-22.
463. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* 1999;13(11):1422-37.
464. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.* 2001;15(21):2852-64.

465. Koromilas AE, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N. mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J.* 1992;11(11):4153-8.
466. Shahbazian D, Parsyan A, Petroulakis E, Topisirovic I, Martineau Y, Gibbs BF, et al. Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. *Mol Cell Biol.* 2010;30(6):1478-85.
467. Joshi S, Kaur S, Kroczyńska B, Plataniotis LC. Mechanisms of mRNA translation of interferon stimulated genes. *Cytokine.* 2010;52(1-2):123-7.
468. Litvak V, Ratushny AV, Lampano AE, Schmitz F, Huang AC, Raman A, et al. A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature.* 2012;490(7420):421-5.
469. Shah OJ, Wang Z, Hunter T. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol.* 2004;14(18):1650-6.
470. Efeyan A, Sabatini DM. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):169-76.
471. Dancy J. mTOR signaling and drug development in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(4):209-19.
472. Hasan M, Gonugunta VK, Dobbs N, Ali A, Palchik G, Calvaruso MA, et al. Chronic innate immune activation of TBK1 suppresses mTORC1 activity and dysregulates cellular metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(4):746-51.
473. Buchkovich NJ, Yu Y, Zampieri CA, Alwine JC. The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(4):266-75.
474. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 2004;18(23):2893-904.
475. van den Beucken T, Koritzinsky M, Wouters BG. Translational control of gene expression during hypoxia. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(7):749-55.
476. Ellisen LW. Growth control under stress: mTOR regulation through the REDD1-TSC pathway. *Cell Cycle.* 2005;4(11):1500-02.
477. Schneider RJ, Mohr I. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(3):130-6.
478. Sarnow P, Cevallos RC, Jan E. Takeover of host ribosomes by divergent IRES elements. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 6):1479-82.
479. Ryabova LA, Pooggin MM, Hohn T. Viral strategies of translation initiation: ribosomal shunt and reinitiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002;72:1-39.

480. Li J, Liu K, Liu Y, Xu Y, Zhang F, Yang H, et al. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN-alpha-induced antiviral activity. *Nat Immunol.* 2013;14(8):793-803.
481. Okumura A, Lu G, Pitha-Rowe I, Pitha PM. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1440-5.
482. Okumura A, Pitha PM, Harty RN. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(10):3974-9.
483. Tikhomirova EE, Sidorova NA. [Cytological characteristics of malignant soft-tissue histiocytoma]. *Lab Delo.* 1986(4):246-7. Tsitologicheskaja kharakteristika zlokachestvennoi gistotsitomy miagkikh tkanei.
484. Pincetic A, Kuang Z, Seo EJ, Leis J. The interferon-induced gene ISG15 blocks retrovirus release from cells late in the budding process. *J Virol.* 2010;84(9):4725-36.
485. Sanyal S, Ashour J, Maruyama T, Altenburg AF, Cragnolini JJ, Bilate A, et al. Type I interferon imposes a TSG101/ISG15 checkpoint at the Golgi for glycoprotein trafficking during influenza virus infection. *Cell Host Microbe.* 2013;14(5):510-21.
486. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, Fernandez-Delgado I, Torralba D, Moreno-Gonzalo O, et al. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat Commun.* 2016;7:13588.
487. Schlundt A, Sticht J, Piotukh K, Kosslick D, Jahnke N, Keller S, et al. Proline-rich sequence recognition: II. Proteomics analysis of Tsg101 ubiquitin-E2-like variant (UEV) interactions. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(11):2474-86.
488. Hein MY, Hubner NC, Poser I, Cox J, Nagaraj N, Toyoda Y, et al. A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell.* 2015;163(3):712-23.
489. Wan C, Borgeson B, Phanse S, Tu F, Drew K, Clark G, et al. Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes. *Nature.* 2015;525(7569):339-44.
490. Wynne C, Lazzari E, Smith S, McCarthy EM, Ni Gabhann J, Kallal LE, et al. TRIM68 negatively regulates IFN-beta production by degrading TRK fused gene, a novel driver of IFN-beta downstream of anti-viral detection systems. *PloS one.* 2014;9(7):e101503.
491. Yu Y, Yoon SO, Poulgiannis G, Yang Q, Ma XM, Villen J, et al. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science.* 2011;332(6035):1322-6.



## **ANNEXE : ARTICLE EN CO-AUTEUR**

### **MISE EN CONTEXTE**

Le présent mémoire présente les grandes molécules régulatrices et le système d'organisation structurel sur lequel s'assoit la réponse antivirale. Au-delà de ces acteurs clés et bien caractérisés de la signalisation de l'immunité innée antivirale, une myriade de facteurs supplémentaire influence la réponse antivirale en régulant positivement ou négativement l'activité d'effecteurs majeurs de la signalisation antivirale. Cette étude s'inscrit ainsi dans l'identification de facteurs impliqués dans la régulation fine de la voie de signalisation RLR-IRF3. IRF3 et ses coactivateurs CBP/p300 sont sujets à plusieurs modifications post-traductionnelles régulatrices. Récemment,  $\beta$ -caténine a d'ailleurs été identifiée en tant que coactivateur permettant la transcription d'IFNs- $\beta$  en facilitant le recrutement de CBP/p300 à IRF3.

À travers cette étude, nous identifions les isoformes de la *glycogen synthase kinase* (GSK-3 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$ ) comme étant nécessaire à la formation d'une réponse antivirale adéquate. Cet effet découlerait d'ailleurs de leur activité kinase. L'activation des isoformes de GSK-3 suivant une infection virale résulte en fait en la phosphorylation de  $\beta$ -caténine promulguant par le fait même la liaison à l'ADN d'IRF3 et la production d'ISGs.

### **CONTRIBUTION**

- Formulation d'hypothèses
- Optimisation des protocoles expérimentaux
- Réalisation des expérimentations
- Contribution à l'écriture du manuscrit.

# Fine-Tuning of the RIG-I-Like Receptor/Interferon Regulatory Factor 3-Dependent Antiviral Innate Immune Response by the Glycogen Synthase Kinase 3/ $\beta$ -Catenin Pathway

Kashif Aziz Khan,<sup>a\*</sup> Florence Dô,<sup>a</sup> Alexandre Marineau,<sup>a</sup> Priscilla Doyon,<sup>a</sup> Jean-François Clément,<sup>a</sup> James R. Woodgett,<sup>b</sup> Bradley W. Doble,<sup>c</sup> Marc J. Servant<sup>a</sup>

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada<sup>a</sup>; Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada<sup>b</sup>; Stem Cell and Cancer Research Institute, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada<sup>c</sup>

**Induction of an antiviral innate immune response relies on pattern recognition receptors, including retinoic acid-inducible gene 1-like receptors (RLR), to detect invading pathogens, resulting in the activation of multiple latent transcription factors, including interferon regulatory factor 3 (IRF3). Upon sensing of viral RNA and DNA, IRF3 is phosphorylated and recruits coactivators to induce type I interferons (IFNs) and selected sets of IRF3-regulated IFN-stimulated genes (ISGs) such as those for ISG54 (*Ifit2*), ISG56 (*Ifit1*), and viperin (*Rsad2*). Here, we used wild-type, glycogen synthase kinase 3 $\alpha$  knockout (GSK-3 $\alpha^{-/-}$ ), GSK-3 $\beta^{-/-}$ , and GSK-3 $\alpha/\beta$  double-knockout (DKO) embryonic stem (ES) cells, as well as GSK-3 $\beta^{-/-}$  mouse embryonic fibroblast cells in which GSK-3 $\alpha$  was knocked down to demonstrate that both isoforms of GSK-3, GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ , are required for this antiviral immune response. Moreover, the use of two selective small-molecule GSK-3 inhibitors (CHIR99021 and BIO-accetoxime) or ES cells reconstituted with the catalytically inactive versions of GSK-3 isoforms showed that GSK-3 activity is required for optimal induction of antiviral innate immunity. Mechanistically, GSK-3 isoform activation following Sendai virus infection results in phosphorylation of  $\beta$ -catenin at S33/S37/T41, promoting IRF3 DNA binding and activation of IRF3-regulated ISGs. This study identifies the role of a GSK-3/ $\beta$ -catenin axis in antiviral innate immunity.**

Induction of an antiviral innate immune response relies on pattern recognition receptors, including those belonging to the retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors (RLR), Toll-like receptor (TLR), and recently characterized DNA sensor families, to detect and respond to invading pathogens, resulting in the production of type I interferons (IFNs) and proinflammatory cytokines (1, 2). The expression of these cytokines is the result of the activation of signaling pathways that culminate in the activation of a number of latent transcription factors, including IFN regulatory factor 3 (IRF3) (3). C-terminal phosphorylation of IRF3 by the  $\text{I}\kappa\text{B}$  kinase (IKK)-related kinases TANK-binding kinase 1 (TBK1) and IKKi (4, 5) results in its dimerization and interaction with the transcriptional coactivators CREB-binding protein (CBP)/p300, which are required for the DNA binding activity of IRF3 to induce type I IFNs and selected sets of IRF3-regulated IFN-stimulated genes (ISGs) such as those for ISG54 (*Ifit2*), ISG56 (*Ifit1*), and viperin (*Rsad2*) (6). Recently,  $\beta$ -catenin has also been reported to act as a coactivator of IFN- $\beta$  transcription allowing the recruitment of the acetyltransferase CBP/p300 to IRF3 (7–9). IRF3 and its coactivators are subject to positive or negative regulation by posttranslational modifications, protein phosphorylation being the most common (9–11).

Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) is a serine/threonine protein kinase that is expressed ubiquitously in most cell types. In mammals, two distinct genes encode GSK-3, generating two related proteins, GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ . The kinase domains of these GSK-3 isoforms are 98% similar in their coding sequences and 85% similar in their amino acid sequences (12). Unlike most protein kinases, GSK-3 is active in unstimulated resting cells and can be positively or negatively regulated by phosphorylation. Kinase activity of GSK-3 is negatively regulated by phosphorylation at residue Ser9 on GSK-3 $\beta$  and residue Ser21 on GSK-3 $\alpha$ , while

phosphorylation of a tyrosine residue located in the T loop (Tyr279 in GSK-3 $\alpha$  and Tyr216 in GSK-3 $\beta$ ) allows increased and sustained phosphotransferase activity toward a large number of substrates (13, 14). One key substrate of GSK-3 is  $\beta$ -catenin, the intracellular cytoplasmic levels of which are kept low in resting cells by degradation via a multiprotein destruction complex containing GSK-3, casein kinase 1 (CK1), axin, adenomatous polyposis coli, protein phosphatase 2A (PP2A), and the E3-ubiquitin ligase  $\beta$ -transducin repeat-containing proteins ( $\beta$ -TrCP) (15).  $\beta$ -Catenin is phosphorylated by CK1 at Ser45, creating a priming site for phosphorylation by GSK-3, which in turn phosphorylates  $\beta$ -catenin at Thr41, Ser37, and Ser33 in a sequential manner. Phosphorylation of Ser37 and Ser33 creates a binding site for  $\beta$ -TrCP, resulting in proteosomal degradation of  $\beta$ -catenin (16). Therefore, these GSK-3 phosphoacceptor sites are part of a domain of  $\beta$ -catenin often qualified as the phosphodegron motif.

Received 2 April 2015 Returned for modification 27 April 2015

Accepted 17 June 2015

Accepted manuscript posted online 22 June 2015

Citation Khan KA, Dô F, Marineau A, Doyon P, Clément J-F, Woodgett JR, Doble BW, Servant MJ. 2015. Fine-tuning of the RIG-I-like receptor/interferon regulatory factor 3-dependent antiviral innate immune response by the glycogen synthase kinase 3/ $\beta$ -catenin pathway. *Mol Cell Biol* 35:3029–3043. doi:10.1128/MCB.00344-15.

Address correspondence to Marc J. Servant, marc.servant@umontreal.ca.

\* Present address: Kashif Aziz Khan, Department of Biology, York University, Toronto, Ontario, Canada.

A.M. and P.D. contributed equally to this work.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/MCB.00344-15

Recently, it was shown that  $\beta$ -catenin phosphorylation by GSK-3 does not inevitably lead to its degradation but may have important regulatory functions (reviewed in references 17 and 18).

GSK-3 influences a multitude of cellular activities, such as glucose metabolism, transcriptional regulation, oncogenesis, the cell cycle, and immunity, and dysregulation of the kinase has been linked to the initiation and progression of diseases such as Alzheimer's disease, diabetes, and cancer. The isoforms GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  have redundant functions in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling (19, 20), early stages of chondrocyte differentiation (21), and mixed-lineage leukemia cell proliferation and transformation (22). However, their roles do not entirely overlap, as the ablation of each isoform in the mouse has a distinct consequence. GSK-3 $\beta$  knockout mice die before or at birth because of liver apoptosis or malformation of the heart (23, 24), while animals lacking GSK-3 $\alpha$  are viable but sensitized to insulin (25). Indeed, GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  have been shown to have different functions in metabolism, cell differentiation, and cardiovascular development (26–28). At the molecular level, both isoforms play important roles in various signaling pathways, including the Wnt, Notch, Hedgehog, nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK), cyclic AMP, transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )/activin, phosphatidylinositol-3' kinase, jun kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK), and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathways (29). These protein kinases influence multiple components of the innate and adaptive arms of the immune system, where they act as important regulators of the fine balance between pro- and anti-inflammatory cytokine production (30). Interestingly, most of the functions of GSK-3 isoforms in immune systems are mediated through control of transcription factors mediating cytokine production (reviewed in reference 31).

More recently, GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin have been shown to play important roles in the context of antiviral innate immunity and the type I IFN response. In the case of TLR4 stimulation, GSK-3 $\beta$  negatively regulates (32) while  $\beta$ -catenin promotes IFN- $\beta$  production in response to lipopolysaccharides (7). However, in RLR signaling pathways, a consensus picture has not yet emerged, likely because of the use of different experimental strategies, non-selective GSK-3 inhibitors, overexpression conditions, and *in vitro* assays. In fact, GSK-3 was shown to either negatively (33) or positively (34) regulate the antiviral type I IFN response. Interestingly, the latter study proposed that the GSK-3 $\beta$  isoform (but not GSK-3 $\alpha$ ) plays positive roles in virus-triggered IRF3 activation and IFN- $\beta$  induction by promoting TBK1 activation in a manner independent of its kinase activity. As for the GSK-3 substrate  $\beta$ -catenin, it was reported to act as a coactivator in IRF3-mediated *ifnb* gene activation in response to Sendai virus (SeV) and vesicular stomatitis virus (VSV) infections, but the role of a GSK-3/ $\beta$ -catenin axis was not addressed (7, 8). Therefore, despite efforts to ascertain the role of GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin involvement in the antiviral responses, a comprehensive study addressing both isoforms of GSK-3 and the role of the GSK-3/ $\beta$ -catenin axis in antiviral innate immunity was lacking.

Here, we report the essential roles of both GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in antiviral innate signaling, indicating that GSK-3 is an important regulator of the cellular antiviral response. In addition, by using molecular and pharmacological approaches, we demonstrate that functions of GSK-3 are dependent upon its kinase ac-

tivity through the phosphorylation of  $\beta$ -catenin, facilitating IRF3 DNA binding.

## MATERIALS AND METHODS

**Antibodies, reagents, and plasmids.** Anti-GSK-3 $\alpha$  (catalog no. 9338), anti-GSK-3 $\beta$  (catalog no. 9315), anti-p-GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  Thr279/216 (catalog no. G5791), anti-p-IRF3 Ser396 (4D4G; catalog no. 4947), anti-p-TBK1/NAK Ser172 (D52C2; catalog no. 5483), and anti-p- $\beta$ -catenin Ser33/37/Thr41 (catalog no. 9561) antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). Anti-human ISG54 (catalog no. NBP1-31164), anti-human ISG56 (catalog no. NBP1-32329), and anti-TBK1 (72B587; catalog no. IMG-270A) antibodies were purchased from Novus Biologicals (Littleton, CO). Anti-CBP (A-22; catalog no. sc-369/sc-369X) and anti-IRF3 (FL-425 [catalog no. sc9082/sc-9082X] and C-20 [catalog no. sc-15991]) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-FLAG (catalog no. F7425), anti- $\beta$ -actin (AC-74; catalog no. A2228), and anti- $\alpha$ -tubulin (DM1A; catalog no. T6199) antibodies were purchased from Sigma, Oakville, ON, Canada.  $\beta$ -Catenin (catalog no. 2337-1; Epitomics, Burlingame, CA), mouse  $\beta$ -catenin active (catalog no. 05-666; Millipore), and viperin (AT131; catalog no. ALX-210-956; Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA) antibodies were from the companies indicated. Anti-mouse ISG54 and anti-mouse ISG56 were kindly provided by Ganes C. Sen (The Lerner Research Institute, Cleveland, OH). Poly(I · C) was from GE HealthCare (Waukesha, WI) and was transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) at a final concentration of 1.0  $\mu$ g/ml. CHIR99021 (CHIR; catalog no. 1748-5) was purchased from BioVision (Milpitas, CA), and BIO-acetoxime (BIO-ac; catalog no. 361551) was obtained from EMD Millipore Chemicals (Billerica, MA). Polybrene and puromycin were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Reporter plasmids pGL3-IFN- $\beta$ -Luc and pGL3-ISRE-Luc have been described previously (35). pNF- $\kappa$ B-Luc was from Stratagene (La Jolla, CA), and *Renilla* reporter plasmid pRL-TK was from Promega (Madison, WI). Plasmids encoding FLAG-TBK1, FLAG-IKKi, and FLAG-IRF3-5D were provided by Rongtuan Lin (McGill University, Montreal, Quebec, Canada), and a plasmid encoding FLAG- $\beta$ -catenin was provided by Daniel Lamarre (Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada). Plasmid pGL3-OT (TOPFlash) was a kind gift from Sylvain Meloche (Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada). Lentiviral plasmid pLenti6-V5-LargeT was kindly provided by Sylvain Meloche (Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada) with kind permission from Bernard Thorens (University of Lausanne, Lausanne, Switzerland). A phosphodeficient mutant form of  $\beta$ -catenin (S33A S37A T41A; referred to here as  $\beta$ -catenin 3A) was generated with the QuikChange Multi site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

**Cell culture and infections.** Human cervical carcinoma (HeLa), human endometrial carcinoma 1B (HEC-1-B), and human embryonic kidney (HEK) 293T cell lines and primary human fetal lung fibroblasts (MRC-5) were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA), and immortalized GSK-3 $\beta$  knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs) have been described previously (23). All cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (Multicell, Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Multicell, Wisent). SeV strain Cantell was obtained from Specific-Pathogen-Free Avian Supply (Charles River Laboratories, North Franklin, CT) and used at 200 hemagglutinating units (HAU)/ml. Green fluorescent protein (GFP)-expressing VSV (VSV-M51R-GFP; kindly provided by Benjamin tenOever, Mount Sinai Hospital, New York, NY) was propagated in Vero cells and quantified by standard plaque assay.

**ES cell lines and culture.** Wild-type (WT), GSK-3 $\alpha$ <sup>-/-</sup>, GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup>, and GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  double-knockout (DKO) mouse embryonic stem (ES) cell lines have previously been described (19, 36). Cell lines generated from DKO mouse ES cells that stably express WT or kinase-dead (K148A) GSK-3 $\alpha$  and WT or kinase-dead (K85A) GSK-3 $\beta$  have been described earlier (19, 36).

TABLE 1 RT-qPCR probes and primers used in this study

Gene	RefSeq accession no.	UPL probe	Primer sequence	
			Forward	Reverse
<i>Ifnb1</i>	NM_010510.1	18	CTGGCTTCCATCATGAACAA	AGAGGGCTGTGGTGGAGAA
<i>Rsad2</i>	NM_021384	100	GAGATTCTGCAAGGAGGAGCTA	TGTCGCAGGAGATAGCAAGA
<i>Ifit1</i>	NM_008331.3	6	TCTAAACAGGGCCTTGACAG	GCAGAGCCCTTTTGGATAATGT
<i>Ifit2</i>	NM_008332.3	42	CAATGCTTAGGGGAAGCTGA	TGATTCTACTTGGTCAGGATGC
<i>Hprt</i>	NM_013556.2	95	TCCTCCTCAGACCCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC
<i>Tbp</i>	NM_013684.3	107	CGGTCGCGTCATTTTCTC	GGGTTATCTCACACACCATGA

All of the ES cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (Multicell, Wisent) supplemented with 15% ES cell-tested fetal bovine serum (Multicell, Wisent), 100 μM 2-mercaptoethanol (catalog no. M7522; Sigma-Aldrich), 1 mM modified Eagle medium nonessential amino acids (Wisent), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate (Wisent), and 1,000 U/ml leukemia inhibitory factor (ESGRO; Millipore). Stable cell lines were maintained in medium supplemented with 250 μg/ml hygromycin (Invitrogen) to maintain selective pressure for transgene expression. Hygromycin was removed from the culture 24 h before each experiment to rule out possible interference.

**Cre-mediated deletion of exon 3 of the mouse β-catenin gene.** Non-immortalized *CATNB<sup>ex3-flox/flox/+</sup>* MEFs were infected with the adenoviral Cre recombinase expression system Ad(RGD)-GFP-iCre (Vector Biolabs, Philadelphia, PA) at a multiplicity of infection (MOI) of 500 to delete exon 3 of the mouse β-catenin gene. Cells were maintained for a further 4 days to ensure turnover of the residual β-catenin protein before infection with SeV for 8 h, and RNA was isolated for reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). *CATNB<sup>ex3-flox/flox/+</sup>* MEFs were immortalized by lentivirus-based large T antigen expression and used for electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and VSV-GFP-based antiviral assays. Immortalized *CATNB<sup>ex3-flox/flox/+</sup>* MEFs were infected with the Cre recombinase expression system Ad(RGD)-GFP-iCre or Ad(RGD)-CMV-iCre (Vector Biolabs) as described above or, as controls, infected with Ad(RDG)-GFP or Ad(RDG)-CMV-Luc (Vector Biolabs), respectively.

**Lentiviral vector production and transduction.** The RNAi Consortium (TRC)/Mission shRNA lentiviral vectors targeting GSK-3α (TRCN000010340 and TRCN000038681) and nontargeting control (SHC002) short hairpin RNA (shRNA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Lentiviral vector production was conducted as described previously (37). Briefly, 293T cells ( $3.5 \times 10^6$  in a 100-mm dish) were transfected with 6 μg of a nontargeting control, specific shRNA, or pLenti6-V5-LargeT along with 1.5 μg of pMDLg/pRRE, 1.5 μg of pRSV-REV, and 3 μg of pVSVg. The medium was replaced with fresh medium at 16 h posttransfection. On the following day, medium containing lentivirus was harvested and filtered through a 0.45-μm filter before storage at -80°C until use. Lentiviral titers were determined by limiting-dilution assay with HeLa cells as described previously (38). GSK-3β<sup>-/-</sup> or *CATNB<sup>ex3-flox/flox/+</sup>* MEFs were infected with lentivirus for 24 h in the presence of 8 μg/ml Polybrene and then subjected to puromycin or blasticidin selection, respectively, for 4 days (2 μg/ml). Following selection, the immortalized *CATNB<sup>ex3-flox/flox/+</sup>* MEFs were maintained in culture in the presence of blasticidin (1 μg/ml).

**Western blot and coimmunoprecipitation analyses.** Western blot and coimmunoprecipitation analyses were accomplished according to previously described procedures (35, 39). Briefly, whole-cell extracts (WCEs) were prepared in Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl; 50 mM NaF; 5 mM EDTA; 10% glycerol; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 40 mM β-glycerophosphate; 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 5 μg/ml of leupeptin, pepstatin, and aprotinin; 1% Triton X-100) and resolved by 7.5 or 10% SDS-PAGE with an SE400 electrophoresis apparatus (GE Healthcare). The proteins were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (BioTrace NT, Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI) with a Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad). The membranes

were probed with primary antibodies, followed by a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary Ig raised against the appropriate species (KPL, Gaithersburg, MD), and bands were detected with the Western Lightning ECL kit (Perkin-Elmer, Waltham, MA). For coimmunoprecipitation assays, WCEs were incubated with 1 μg of antibody at 4°C overnight. Immune complexes were captured with 40 μl of a protein A-Sepharose suspension and washed five times with Triton X-100 lysis buffer complemented with protease inhibitors, and bound proteins were eluted with 50 μl of 2× sample buffer.

**RNA isolation and RT-qPCR analysis.** Relative mRNA expression was performed by RT-qPCR analysis as previously described (35). After stimulation, total RNA was extracted from ES cells with TRIzol reagent (Invitrogen). RNA was quantified with NanoPhotometer (Implen GmbH, Munich, Germany), and samples were evaluated for integrity with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). RNA (2 μg) was reverse transcribed into cDNA with the High Capacity cDNA reverse transcription kit with random primers (Applied Biosystems), and qPCR analysis was performed by TaqMan technology on an ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems) as described by the manufacturer. Reaction mixtures contained 1.5 μl of cDNA (diluted 1/5), 5 μl of 2× TaqMan Fast qPCR master mix (Applied Biosystems), and 0.5 μl of 20× TaqMan gene expression assay (Applied Biosystems) in a final volume of 10 μl in a 384-well plate. A no-template control (in which the cDNA was replaced with water) was included. Amplification conditions were 95°C for 3 min, followed by 45 cycles of 95°C for 5 s and 60°C for 30 s. All qPCRs were done in triplicate for each sample and all of the genes. Relative mRNA expression was calculated according to the comparative threshold ( $C_T$ ) formula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , where  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$  test sample -  $\Delta C_T$  calibrator sample and  $\Delta C_T = C_T$ (target) -  $C_T$ (endogenous control). *Hprt* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene) and *Tbp* (TATA binding protein gene) were used as endogenous control genes. The sequences of the primers and Universal Probe Library (UPL) probes used are listed in Table 1.

**Reporter gene assays and ELISA.** Subconfluent 293T cells ( $0.4 \times 10^6$ ) were transfected with 40 ng of pGL3-IFN-β-Luc or pGL3-ISRE-Luc or pGL3-OT (TOPFlash) along with 10 ng of the pRL-TK reporter (internal control expressing *Renilla* luciferase) by the CaPO<sub>4</sub> transfection method in 48-well plates. Cells were harvested 24 h posttransfection and lysed with passive lysis buffer (Promega). Extracts were assayed with a Dual-Luciferase reporter assay kit (Promega) according to the manufacturer's instructions, and data were expressed as firefly luciferase values divided by *Renilla* luciferase values. IFN-β production in supernatants was determined with the VeriKine mouse IFN-β enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (PBL Assay Science, Piscataway, NJ) according to the manufacturer's instructions.

**VSV-GFP-based antiviral assay and flow cytometry analysis.** The antiviral state of cells following GSK-3α knockdown or deletion of exon 3 of the β-catenin gene was measured by VSV-GFP reporter virus replication as described previously (40). Briefly, cells were infected with VSV-M51R-GFP and monolayers were examined and photographed with an inverted fluorescence microscope (Zeiss, Goettingen, Germany) at 16 h postinfection. Moreover, VSV-M51R-GFP-infected cells were trypsinized, fixed with 2% paraformaldehyde in phosphate-

buffered saline (PBS), and analyzed by FACScalibur (BD Bioscience) with BD FACSDiva software.

**EMSA.** To measure IRF3 DNA binding activity, an EMSA was performed as previously described (41). Briefly, 15  $\mu$ g of nuclear extract was incubated with 500,000 cpm of a  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-labeled double-stranded oligonucleotide containing the human ISG15 ISRE (IFN-stimulated response element) at room temperature for 15 min in a DNA binding buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.0), 40 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 4% (vol/vol) Ficoll, 0.08% (vol/vol) Triton X-100, and 2  $\mu$ g of poly(dI-dC) in a final volume of 25  $\mu$ l. Included in parallel were controls in which reaction mixtures were preincubated with 1  $\mu$ l of an anti-IRF3 antibody, a homologous unlabeled oligonucleotide (10-fold), or a mutated unlabeled oligonucleotide (10-fold) for 15 min at 4°C before the addition of the radiolabeled oligonucleotides. In the case of MEF cells, the EMSA reaction was performed with 15  $\mu$ g of WCE at 4°C for 15 min, and as controls, selected samples were preincubated with 2.5  $\mu$ l of an anti-IRF3 antibody for 60 min at 4°C. Reaction products were resolved at 150 V for 3 h on a 5% acrylamide and 0.2% *N,N'*-methylenebisacrylamide polyacrylamide gel in 0.25 $\times$  Tris-borate-EDTA running buffer. The gels were dried and exposed for autoradiography with Typhoon scanner 9410. The sequence of the double-stranded oligonucleotides used (sense orientation) was 5'-GATCGGGAAAGGGAAACCGAACTGAAGCCA-3'. The mutated oligonucleotide was identical except for the substitution of a C for the underlined G (42).

**Chromatin immunoprecipitation (ChIP).** HeLa cells ( $1 \times 10^7$ ) or transfected 293T cells ( $3 \times 10^6$ ) were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature, 125 mM glycine was added, and the mixture was incubated for 5 min. Cells were then washed in ice-cold PBS and lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM NaF; 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate; 1% Triton X-100; 10% glycerol; 0.1% SDS; 0.05% sodium deoxycholate; 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 5  $\mu$ g/ml leupeptin, pepstatin, and aprotinin). Cellular extracts containing chromatin were sonicated on ice to shear the DNA to  $\sim$ 500 bp with a Fisher Sonic Dismembrator 500 (eight cycles of 15 pulses at 30% amplitude). After centrifugation at  $12,000 \times g$  for 5 min at 4°C, soluble chromatin fractions were precleared with protein A/G magnetic beads (Dynabeads; Invitrogen) for 1 h and 5  $\mu$ g of IRF3 antibody (FL-425; Santa Cruz sc-9082X) or FLAG antibody (Sigma F7425) was incubated with 5 to 25  $\mu$ g of chromatin overnight at 4°C. Rabbit IgG was used in parallel as a negative control. Protein-DNA complexes were pulled down with protein A/G magnetic beads for 1 h, washed sequentially with cold low-salt buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.1; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0.1% SDS; 1% Triton X-100), high-salt buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.1; 500 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0.1% SDS; 1% Triton X-100); LiCl wash buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.1; 1 mM EDTA; 250 mM LiCl; 1% NP-40; 1% sodium deoxycholate), and TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.1; 1 mM EDTA) and then eluted with fresh elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) at room temperature. Eluted DNA was reverse cross-linked at 65°C overnight, treated with RNase A (3  $\mu$ g/ml, 30 min at 37°C) and proteinase K (200  $\mu$ g/ml), extracted with phenol-chloroform, and then ethanol precipitated with linear polyacrylamide as the carrier (43). Input and purified DNA was analyzed by qPCR with the EvaGreen-2X kit from ABM (Richmond, BC, Canada) on a Rotor-Gene 2000 apparatus. Each sample was normalized to the input material and shown as fold induction versus dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated samples or mock-infected cells. The primers used have been described earlier (8) and were as follows: ISG56 ISRE, 5'-GAATTC CGCTAGCTTTAGTTTCAC-3' and 5'-CCCAAGACAGTGTATATA AGGG-3'; ISG56 Exon 2, 5'-CCTCCTGGGTTCGTCTACAA-3' and 5'-AATGAAATGTGAAAGTGGCTGATA-3'.

**Statistical analyses.** Statistical analyses were performed with Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Comparison of two groups was carried out with a two-tailed unpaired *t* test, and comparison

of more than two groups was carried out by one-way analysis of variance. Differences were considered significant at *P* values of  $<0.05$ .

#### Identification numbers of genes and proteins mentioned in the text.

The identification numbers of the human and mouse genes and proteins mentioned here are as follows: GSK-3 $\alpha$ , 2931/6064961; GSK-3 $\beta$ , 2932/56637; MAVS, 57506/228607; ISG56, 3434/15957; ISG54, 3433/15958; TBK1, 29110/56480; RIG-I, 23586/230073; IRF3, 54131/3661; IKKi, 9641/56489; IFN- $\beta$ , 3456/15977;  $\beta$ -catenin (CTNNB1), 1499/12387; Cxcl10, 3627/15945; viperin, 91543/58185.

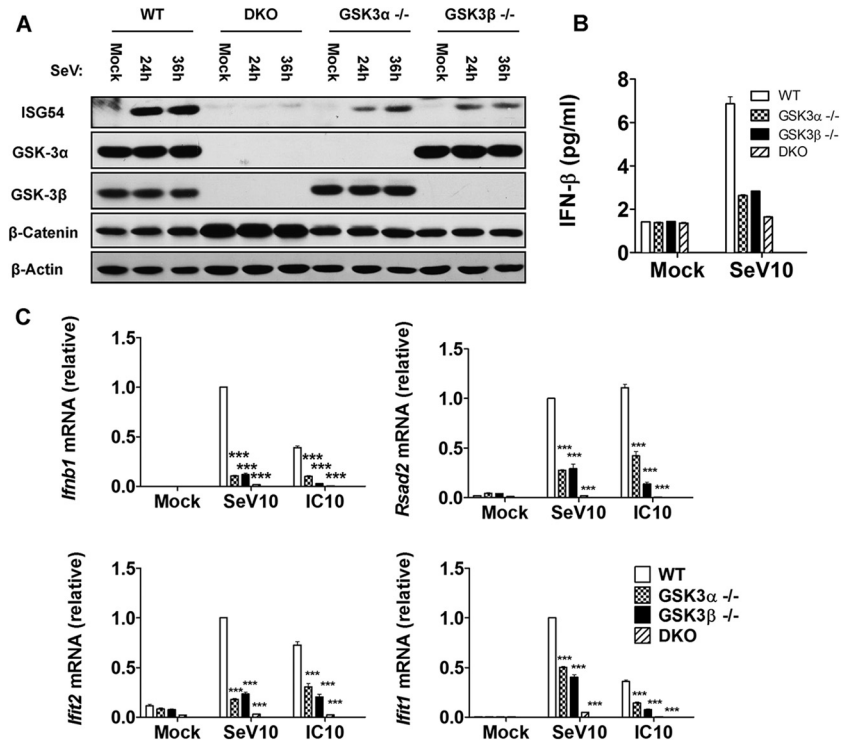
## RESULTS

**Both isoforms of GSK-3, GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ , are required for the induction of representative IRF3-regulated genes.** To clarify the role of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in antiviral signaling, we used an allelic series of mouse undifferentiated ES cells lacking GSK-3 isoforms (WT, GSK-3 $\alpha$ <sup>-/-</sup>, GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup>, or GSK-3 $\alpha/\beta$  DKO). As reported, high levels of  $\beta$ -catenin were found in DKO cells. However, we observed that expression of ISG54 protein and IFN- $\beta$  production in response to SeV infection were decreased in the absence of either isoform of GSK-3 and further decreased in DKO cells (Fig. 1A and B). Consistently, mRNA induction of IRF3-regulated ISGs *Ifnb1*, *Rsad2* (viperin), *Ifit2* (ISG54), and *Ifit1* (ISG56) (44–46) in response to infection with SeV or transfection of synthetic RLR ligand poly(I·C) was decreased in the absence of either isoform of GSK-3 and was severely compromised in DKO cells (Fig. 1C). In comparison to a previous study (34), these findings suggest that, in addition to GSK-3 $\beta$ , GSK-3 $\alpha$  also has a role in antiviral immunity.

To further confirm the involvement of GSK-3 $\alpha$  in a differentiated cell model, we employed shRNA to knock down GSK-3 $\alpha$  in GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup> MEFs. Of the two shRNA constructs used, only one had 100% alignment with the target sequence, which corresponded to the extent of GSK-3 $\alpha$  knockdown (Fig. 2A). Knockdown of GSK-3 $\alpha$  resulted in an increase in  $\beta$ -catenin expression and severely compromised induction of ISG54, ISG56, and viperin activation in response to SeV. Consistently, IFN- $\beta$  production in supernatant and induction of IRF3-regulated genes *Ifnb1*, *Rsad2*, *Ifit2*, and *Ifit1* in response to SeV infection were decreased following the knockdown of GSK-3 $\alpha$  (Fig. 2B and C). Moreover, induction of mRNA for the IRF3-dependent chemokines *Cxcl10* and *Ccl5* was also decreased (data not shown).

Next, to confirm the role of GSK-3 $\alpha$  in a biological context, GFP-expressing VSV was used to measure the antiviral state of GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup> MEFs depleted of GSK-3 $\alpha$ . The VSV mutant (VSV-M51R-GFP) is a useful indicator to assay the antiviral status of cells *in vitro*, as the mutation renders it more sensitive to the inhibitory action of type I IFN (47). In agreement with the observed effect at the level of the IRF3-regulated genes described above, reduction of the GSK-3 $\alpha$  expression level led to a significant increase in VSV-M51R-GFP replication in GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 2D and E). Altogether, our results indicate that the GSK-3 isoforms are essential antiviral signaling effectors that control the induction of IRF3-regulated ISGs.

**Phosphotransferase activity of both GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  is required for antiviral activity.** Having determined the essential roles of the GSK-3 isoforms in the induction of IRF3-regulated genes and the establishment of a functional antiviral state, we examined whether phosphotransferase activity is required for their antiviral functions. We first used the selective GSK-3 inhibitors CHIR and BIO-ac (also called GSK-3 inhibitor X; note that these inhibitors target both isoforms equally) (48, 49). The inhibitory



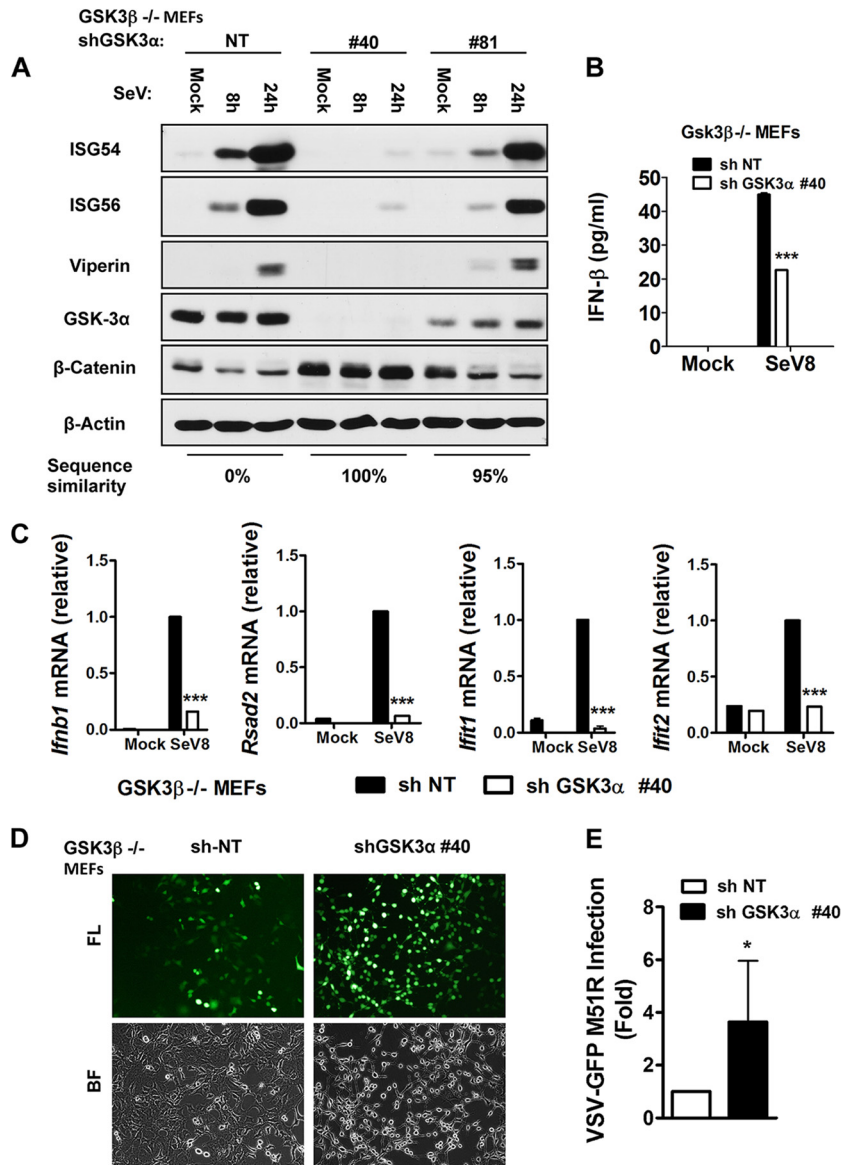
**FIG 1** Essential roles of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in the induction of IRF3-regulated antiviral genes. WT, GSK-3 $\alpha$ <sup>-/-</sup>, GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup>, and GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  DKO ES cells were left uninfected or infected with SeV for the times indicated. (A) Whole-cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the antibodies indicated. (B) Supernatant was collected at the postinfection times indicated and analyzed for IFN- $\beta$  production by ELISA. (C) RNA was extracted and analyzed by RT-qPCR with primers for the genes indicated following infection with SeV or transfection with poly(I·C) (1  $\mu$ g/ml). The expression of each gene is presented relative to gene induction in WT cells infected with SeV. These results are representative of at least two independent experiments with similar results. \*\*\*,  $P < 0.001$ .

activity of these two structurally unrelated ATP competitors was assessed first by treatment of cells transfected with the canonical a TOPFlash reporter construct, a luciferase reporter containing three T-cell factor (TCF) response elements that is activated in response to  $\beta$ -catenin elevation (50). Used at concentrations as low as 2  $\mu$ M, both inhibitors showed activation of the TOPFlash reporter (Fig. 3A), correlating with the stabilization of  $\beta$ -catenin (Fig. 3C), reflecting the high potency of their GSK-3 phosphotransferase-inhibiting activity. The effect of pharmacological inhibition of GSK-3 on the antiviral innate immune response was addressed next. Both inhibitors significantly decreased the SeV-induced activation of the ISRE and IFN- $\beta$  promoters, two IRF3-regulated promoters (Fig. 3B). However, they were less effective in inhibiting the SeV-induced activation of the NF- $\kappa$ B pathway (data not shown). We consistently observed decreases in SeV-induced ISG54 and ISG56 activation in 293T cells treated with BIO-ac or CHIR compared to that in DMSO-treated cells (Fig. 3C). Of note, treatment with both inhibitors resulted in the decreased phosphorylation of Tyr279 in GSK-3 $\alpha$  and Tyr216 in GSK-3 $\beta$ , a commonly used indicator of GSK-3 phosphotransferase activity (51), which resulted in  $\beta$ -catenin accumulation (Fig. 3C).

To further substantiate the role of GSK-3 kinase activity, we used DKO ES cells stably reconstituted with either V5-GSK-3 $\alpha$  (WT or kinase-dead K148A mutant form) or FLAG-GSK-3 $\beta$  (WT or kinase-dead K85A mutant form). Validation of the model with the different constructs was verified at the level of  $\beta$ -catenin phosphorylation on S33/S37/T41, where a phosphosignal was observed only in lysates from WT ES cells and from DKO ES cells comple-

mented with WT V5-GSK-3 $\alpha$  and FLAG-GSK-3 $\beta$  (Fig. 3D, lanes 1, 3, and 5). Conversely, total  $\beta$ -catenin expression was increased in ES cells lacking GSK-3 or expressing kinase-dead versions in DKO cells (Fig. 3D, lanes 2, 4, and 6). Using these validated reconstituted models (19, 36), we demonstrate that the mRNA induction of IRF3-regulated genes was partially (*Rsad2*) or totally (*Ifi1* and *Ifi2*) restored following the expression of either WT V5-GSK-3 $\alpha$  or FLAG-GSK-3 $\beta$ . However, expression of kinase-dead mutants failed to rescue the induction of these ISGs in response to SeV infection (Fig. 3E).

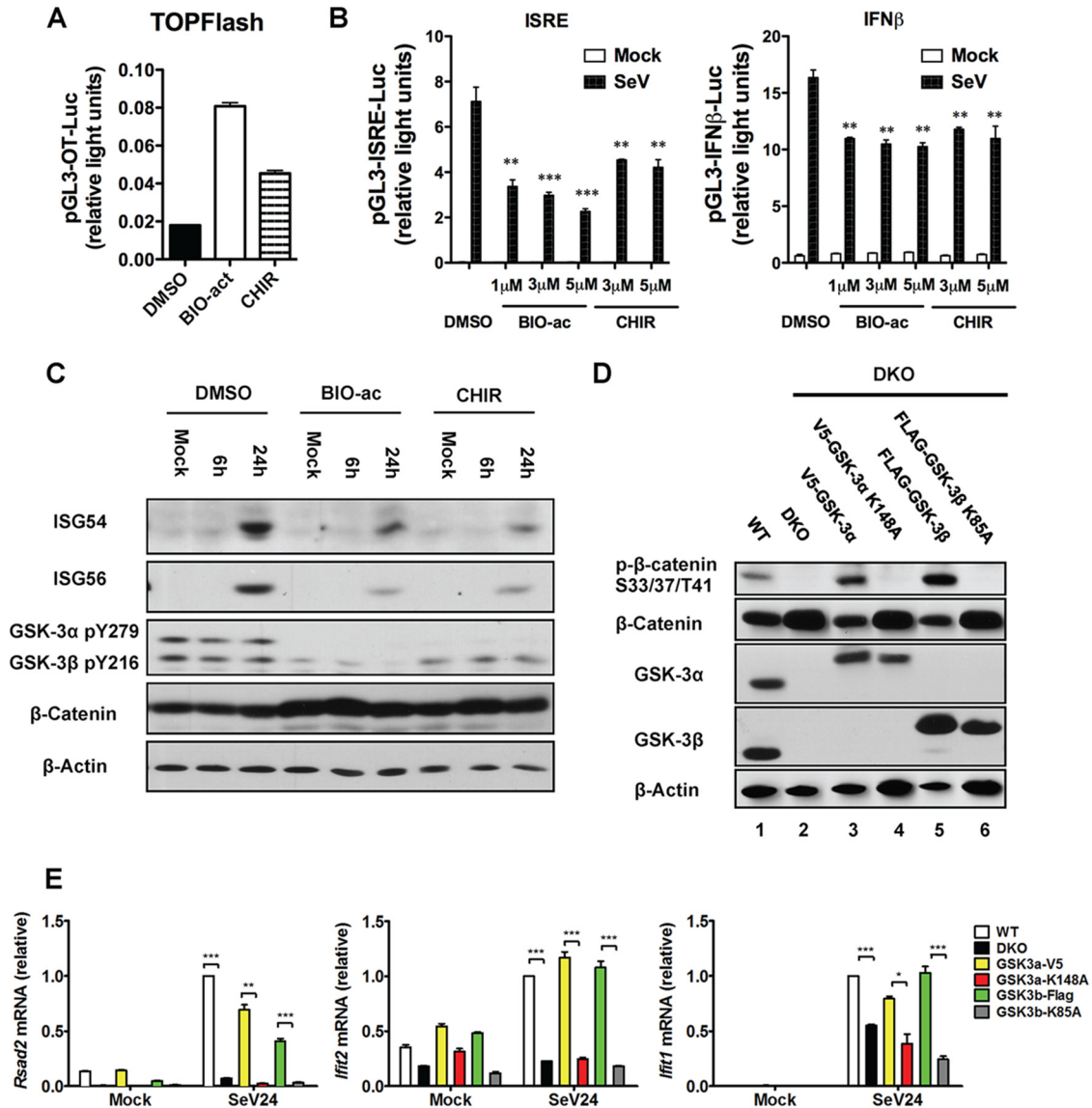
**The GSK-3- $\beta$ -catenin pathway positively regulates antiviral innate immunity downstream of IRF3 activation.** The above data strongly suggest a role for catalytically active GSK-3 isoforms in the regulation of RLR signaling events. Thus, to evaluate at what level of IRF3 signaling GSK-3 might act, we analyzed the effects of GSK-3 inhibitors on ISRE and IFN- $\beta$  activation mediated by multiple RLR signaling pathway effectors, including the RNA sensor RIG-I, mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS), the IRF3 kinases TBK1 and IKKi, and IRF3-5D, a constitutively active form of IRF3 (52). Both GSK-3 inhibitors (BIO-ac and CHIR) resulted in statistically significant inhibition of ISRE and IFN- $\beta$  activation by RIG-I and MAVS (not shown), as well as TBK1, IKKi, and IRF3-5D (Fig. 4A). In line with this, both inhibitors decreased ISG54 and ISG56 induction following the transfection of IRF3-5D (Fig. 4B). Likewise, SeV-induced TBK1 and IRF3 phosphorylation on activating phosphoacceptor sites (11, 53) was not decreased in either 293T cells exposed to GSK-3 inhibitors (Fig. 4C) or GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup> MEF cells in which GSK-3 $\alpha$  was knocked



**FIG 2** GSK-3 $\alpha$  is required for antiviral innate immunity in GSK-3 $\beta^{-/-}$  knockout MEFs. GSK-3 $\beta^{-/-}$  MEFs were infected with lentiviral vectors encoding shRNA targeting GSK-3 $\alpha$  or with a nontargeting (NT) control shRNA and then subjected to puromycin selection as described in Materials and Methods. Cells were then infected with SeV (200 HAU/ml) for the times indicated. (A) Whole-cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the antibodies indicated. #40, lentiviral vector TRCN0000010340; #81, lentiviral vector TRCN0000038681. (B) Supernatant was collected at the postinfection times indicated and analyzed for IFN- $\beta$  production by ELISA. \*\*\*,  $P < 0.001$ . (C) RNA was extracted and analyzed by RT-qPCR with primers for the genes indicated. Expression of mRNA for each gene is presented relative to that in GSK-3 $\beta^{-/-}$  MEFs infected with NT control shRNA. (D) Cells were infected with VSV-M51R-GFP at an MOI of 0.01, and monolayers were examined and photographed with an inverted fluorescence microscope at 16 h postinfection. One representative experiment out of two independent experiments with similar results is shown. (E) VSV-M51R-GFP infection was determined by quantifying the percentage of GFP-positive cells by flow cytometry. The data shown were pooled from two independent experiments and are relative to those obtained with NT shRNA-treated cells. FL, fluorescent; BF, bright field. These results are representative of at least two independent experiments with similar results. \*,  $P < 0.05$ .

down (data not shown). Similarly, the activation of TBK1 and IRF3 and its subsequent nuclear translocation were not impaired in DKO ES cells (Fig. 4D and E). These data support the notion that GSK-3 kinase activity acts downstream of TBK1/IKKi activation, C-terminal domain phosphorylation of IRF3, and its nuclear translocation. Interestingly, IRF3 DNA binding activity was, however, greatly decreased in DKO cells compared to that in WT cells (Fig. 5A). The IRF3 signal was specific, as pretreatment of the binding reaction mixture with an anti-IRF3 antibody interfered

with the signal. As opposed to the use of an excess (10-fold) of an ISRE-mutated unlabeled oligonucleotide, the inclusion of a homologous unlabeled oligonucleotide resulted in undetectable IRF3 DNA binding activity. Accordingly, the DNA binding activity of IRF3 was verified in DKO ES cells stably reconstituted with either (WT or kinase-dead K148A mutant) V5-GSK-3 $\alpha$  or (WT or kinase-dead K85A mutant) FLAG-GSK-3 $\beta$ , as validated in Fig. 3D. As suspected, a partial rescue of IRF3 DNA binding to the ISRE was observed only in ES cells reconstituted with the catalyt-



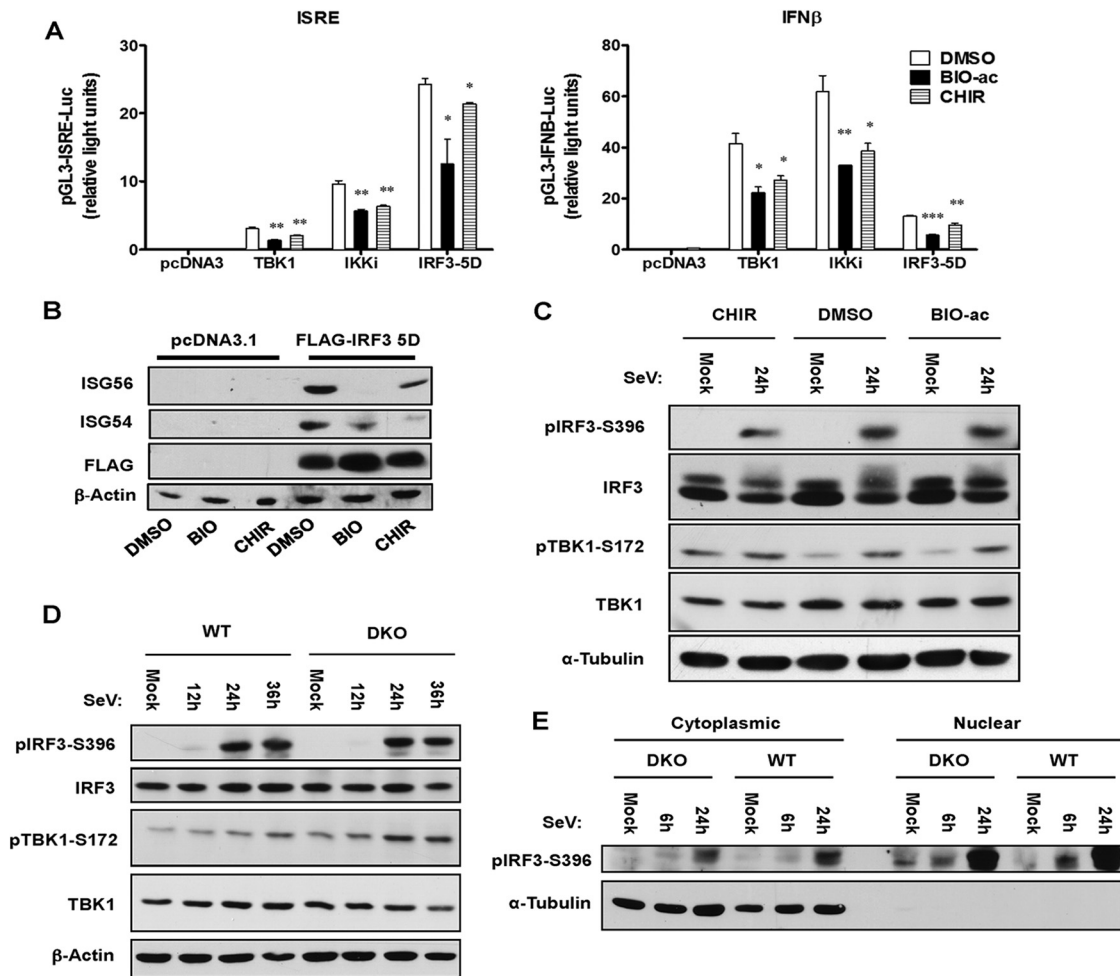
**FIG 3** Pharmacological inhibition of GSK-3 kinase activity blunts antiviral innate immunity. (A) HEK 293T cells were transfected with pGL3-TOPFlash along with pRL-TK. On the next day, cells were incubated with DMSO and a specific GSK-3 inhibitor (2  $\mu$ M BIO-ac or CHIR) for 24 h. (B) HEK 293T cells were transfected with pGL3-IFN $\beta$  or pGL3-ISRE along with pRL-TK. On the next day, cells were incubated with DMSO and a specific GSK-3 inhibitor (BIO-ac or CHIR) for 2 h at the concentrations indicated before infection with SeV for 16 h in the continuous presence of DMSO or an inhibitor. Relative luciferase activity was measured as described in Materials and Methods. Mean values  $\pm$  the standard deviations of triplicates are shown. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . These results are representative of three independent experiments with similar results. (C) HEK 293T cells were incubated with DMSO and a specific GSK-3 inhibitor (2  $\mu$ M BIO-ac or CHIR) for 2 h, followed by SeV for the times indicated in the continuous presence of inhibitors. Whole-cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the antibodies indicated. (D, E) GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  DKO ES cells were stably complemented with either WT or the kinase-dead forms of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ . (D) Whole-cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the antibodies indicated. (E) RNA was extracted from cells left uninfected or infected with SeV for the times indicated and analyzed by RT-qPCR with primers for the genes indicated. Expression of mRNA for each gene is presented relative to that in WT cells infected with SeV. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . These results are representative of at least two independent experiments with similar results.

ically active versions of GSK-3 isoforms (Fig. 5B). This shows that GSK-3 kinase activity likely acts at the transcriptional level, regulating the binding activity of IRF3.

Recent studies have demonstrated a role for  $\beta$ -catenin, the canonical substrate of GSK-3, in IRF3 transcriptional activation (7–9). However, as observed here, an increase in its expression level rather correlates with a decrease in the induction of IRF3-regulated genes (Fig. 1 to 3). To further determine the role of the

GSK-3/ $\beta$ -catenin axis, we used the well-described gain-of-function mutant form of  $\beta$ -catenin in which exon 3, which encodes the crucial Ser/Thr residues for priming by CK1 (Ser45) and phosphorylation by GSK-3 (Ser33, Ser37, and Thr 41), is flanked by two *LoxP* sites (*CATNB<sup>ex3-fllox/fllox</sup>* MEFs). Deletion of exon 3 precludes the phosphorylation of  $\beta$ -catenin by GSK-3, resulting in its stabilization and nuclear accumulation and the transcriptional activation of  $\beta$ -catenin/TCF-responsive genes (54, 55). As ex-



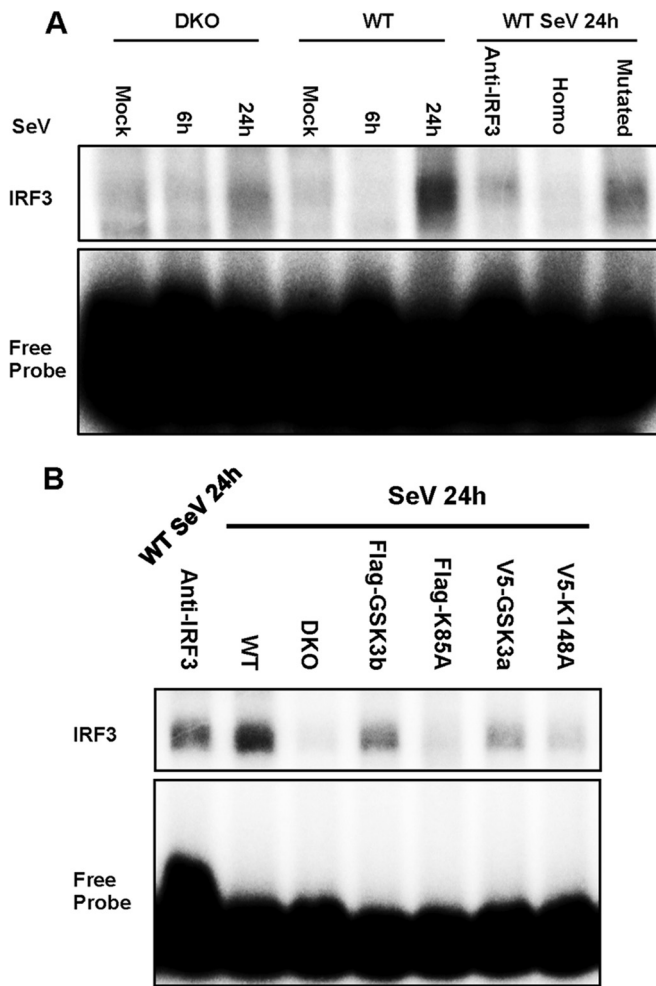


**FIG 4** Absence of GSK-3 does not affect IRF3 activation. (A) HEK 293T cells were cotransfected with pGL3-IFN- $\beta$  or pGL3-ISRE (40 ng of each) along with pRL-TK (10 ng) and the plasmids indicated (10 ng of each). On the next day, cells were incubated with DMSO and a specific GSK-3 inhibitor (BIO-ac or CHIR) for 24 h. Relative luciferase activity was measured as described in Materials and Methods. Mean values  $\pm$  the standard deviations of triplicates are shown. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (B) HEK 293T cells were transfected with FLAG-IRF3-5D. On the next day, cells were incubated with DMSO and a specific GSK-3 inhibitor (2  $\mu$ M BIO-ac or CHIR) for 24 h. Whole-cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the antibodies indicated. One representative experiment out of three independent experiments with similar results is shown. (C) HEK 293T cells were incubated with DMSO and a specific GSK-3 inhibitor (2  $\mu$ M CHIR or BIO-ac) for 2 h, followed by SeV for the times indicated in the continuous presence of inhibitors. Whole-cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the antibodies indicated. (D) WT and GSK-3 $\alpha/\beta$  DKO ES cells were left uninfected or infected with SeV for the times indicated. Whole-cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the antibodies indicated. (E) Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared from WT and GSK-3 $\alpha/\beta$  DKO ES cells left uninfected or infected with SeV for the times indicated and then assayed for IRF3 nuclear translocation by immunoblot analysis. These results are representative of at least two independent experiments with similar results.

pected, excision of exon 3 of the gene for  $\beta$ -catenin by Cre recombinase expression in MEFs resulted in the stabilization of  $\beta$ -catenin (Fig. 6A). Although largely expressed, the generation of the stabilized form of  $\beta$ -catenin correlated with a decrease in DNA binding activity of IRF3 as part of its holocomplex (6) (Fig. 6B). Accordingly, this effect is followed by diminished induction of the *Ifnb1*, *Rsad2*, *Ifit2*, and *Ifit1* mRNAs in response to SeV (Fig. 6C). Moreover, induction of the *Cxcl10* and *Ccl5* chemokine mRNAs was also decreased (data not shown). Furthermore, excision of exon 3 of the  $\beta$ -catenin gene by Cre recombinase expression resulted in a dramatic reduction in the ability of infected cells to mount an antiviral response against VSV (Fig. 6D and E). These results demonstrate that the phosphodegron motif of  $\beta$ -catenin is required for induction of the antiviral innate immune response.

Thus, we speculate that  $\beta$ -catenin phosphorylated by GSK-3

(p- $\beta$ -catenin S33/S37/T41) may act to stimulate IRF3 transcriptional activity. If p- $\beta$ -catenin S33/S37/T41 is required for this function, it should be recruited to the IRF3-CBP/p300 holocomplex following virus infection. This also implies that  $\beta$ -catenin should be phosphorylated on GSK-3 phosphoacceptor sites following virus infection. Indeed, we observed an increase in the phosphorylation of the  $\beta$ -catenin phosphodegron, which follows IRF3 phosphorylation in virus-infected ES cells. As expected, the  $\beta$ -catenin phosphosignal was completely absent from DKO cells (Fig. 7A). In addition, we observed an increase in the  $\beta$ -catenin phosphosignal level following virus infection of HEC-1-B cells, an IFN-unresponsive cell line (56) (Fig. 7B). Importantly, by using coimmunoprecipitation assays with HEC-1-B cells and primary MRC-5 fibroblasts, we documented an accumulation of p- $\beta$ -catenin S33/S37/T41 in IRF3 immunocomplexes following virus



**FIG 5** GSK-3 regulates the DNA binding activity of IRF3. (A) Nuclear extracts used in the experiment shown in Fig. 4E were assayed for DNA binding activity of IRF3 by EMSA. (B) Nuclear extracts were prepared from WT and GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  DKO ES cells, as well as DKO ES cells stably complemented with either WT or the kinase-dead forms of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ , left uninfected or infected with SeV for the times indicated. Nuclear extract was assayed for IRF3 DNA binding activity by EMSA. These results are representative of at least two independent experiments with similar results.

infection (Fig. 7C and D). Moreover, we did not observe any interaction of IRF3 with the unphosphorylated form of  $\beta$ -catenin when using an antibody that specifically recognizes  $\beta$ -catenin when not phosphorylated by GSK-3 (data not shown). Accordingly, ChIP experiments demonstrated that GSK-3 inhibition decreased SeV-induced IRF3 recruitment on the ISG56 gene promoter (Fig. 7E). More importantly, the use of a constitutively active phosphodeficient mutant version of  $\beta$ -catenin (FLAG- $\beta$ -catenin 3A) lacking the GSK-3 phosphoacceptor sites showed that although it was strongly active in the TOPFlash reporter assay (Fig. 7F), it was unable to associate with the ISG56 gene promoter following virus infection (Fig. 7G).

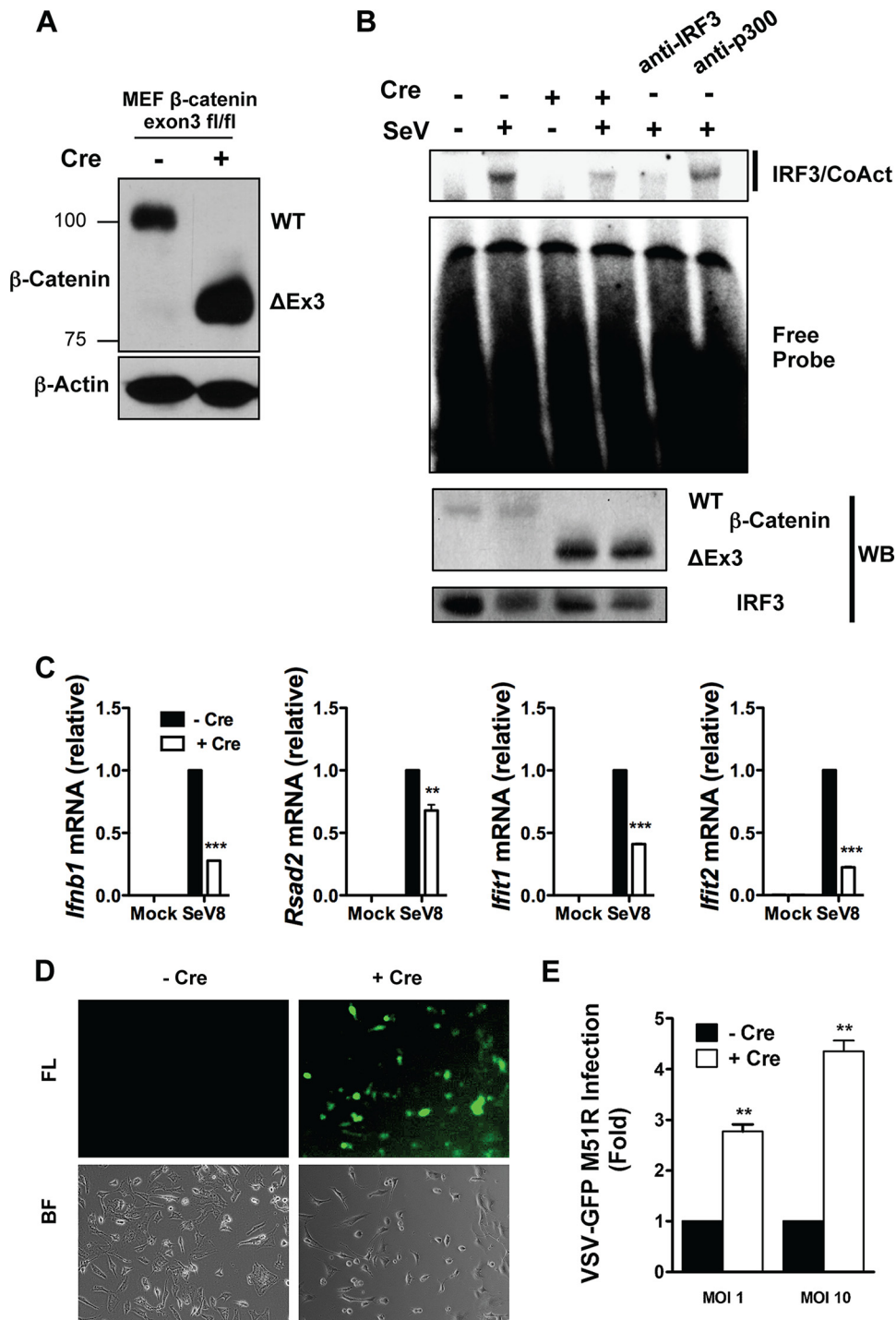
## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first comprehensive report showing the role of GSK-3 $\alpha$ , as well as GSK-3 $\beta$ , in IRF3 signaling through the phosphorylation of  $\beta$ -catenin at S33/S37/T41, supporting a

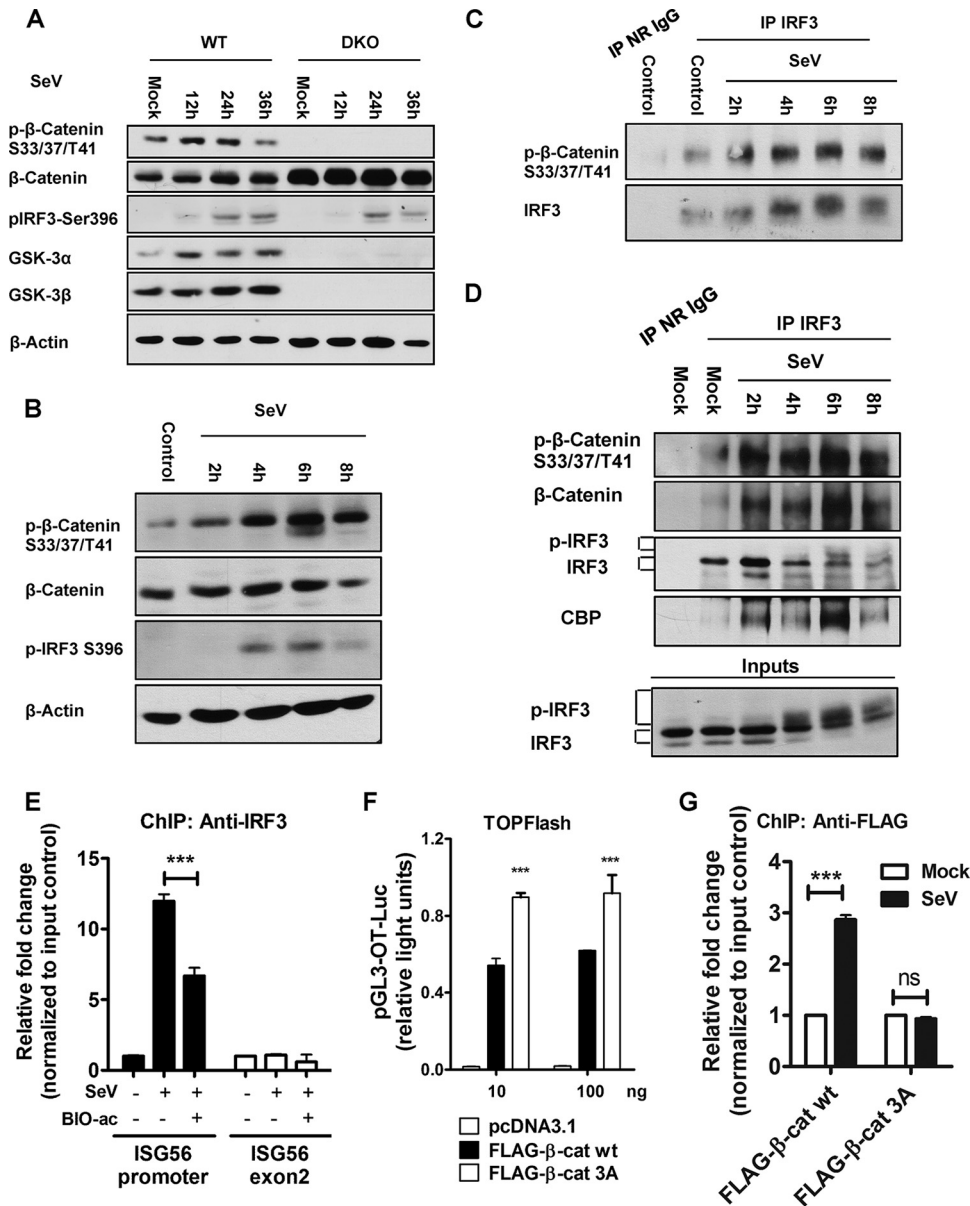
role for GSK-3 as an important regulator of antiviral innate immunity.

Using WT, GSK-3 $\alpha$ <sup>-/-</sup>, GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup>, and GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  DKO mouse ES cells, as well as GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup> MEF cells in which GSK-3 $\alpha$  was silenced, we observed an essential role for GSK-3 $\alpha$ , as well as GSK-3 $\beta$ , in the induction of selected sets of IRF3-regulated ISGs in response to SeV infection. Interestingly, the severely compromised antiviral response in DKO cells was partially (*Rsad2*) or totally (*Ifit1* and *Ifit2*) restored following the stable expression of either WT V5-GSK-3 $\alpha$  or FLAG-GSK-3 $\beta$ . Furthermore, by using molecular and pharmacological approaches, we demonstrate that the optimal induction of IRF3-regulated antiviral genes is dependent upon the phosphotransferase activity of GSK-3. Indeed, inhibition of GSK-3 kinase activity by two highly selective and structurally unrelated inhibitors (CHIR or BIO-ac) resulted in the decreased induction of ISRE and IFN- $\beta$  gene promoters and antiviral genes. In line with this, inhibition of GSK-3 by BIO-ac has been reported to inhibit antiviral innate immunity in a  $\beta$ -catenin-dependent fashion (38). The inhibitors used in our study were shown to be quite selective. CHIR was reported to be a very selective inhibitor of GSK-3 in a study in which multiple GSK-3 inhibitors were profiled against a panel of >70 protein kinases (49). BIO-ac is a more selective analogue of 6-bromoindirubin-32-oxime (BIO; also called GSK-3 inhibitor IX) and exhibits greater selectivity for GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  than for cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)/p25, Cdk2/A, and Cdk1/B (48). As pharmacological inhibitors are prone to off-target effects, we used the GSK-3 inhibitors at low concentrations (2 to 5  $\mu$ M). Other studies have used CHIR (57–61), BIO (62, 63), and BIO-ac (38, 64) at concentrations as high as 10 to 20  $\mu$ M. Moreover, reconstitution of DKO ES cells with kinase-dead forms of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  showed decreased antiviral mRNA expression compared to that obtained by reconstitution with WT forms. Although we do not completely rule out a kinase-independent function for GSK-3 in innate immunity, our data obtained with DKO ES cells and GSK-3 inhibitors (Fig. 4) do not support the proposed role for GSK-3 in the activation of TBK1 following virus infection reported earlier (34). Therefore, our observations extend the understanding of the molecular role of GSK-3 isoforms in the antiviral response by questioning previous reports either proposing a negative role for GSK-3 (33) or suggesting that a catalytically inactive version of GSK-3 $\beta$  alone is sufficient for antiviral innate immunity (34). We therefore believe that the genetic and molecular approaches coupled with the use of selective pharmacological inhibitors at low concentrations favor a model where the catalytic activity of GSK-3 isoforms is indeed required for an optimal antiviral innate immune response.

Transcriptional regulation of IFN- $\beta$  relies upon the activation and cooperative binding of multiple transcription factors, including IRF3, NF- $\kappa$ B, and ATF-2/c-Jun and transcriptional coactivators CBP/p300 (65). Constitutively expressed transcription factor IRF3 has a central role in the induction of immediate-early genes, including that for IFN- $\beta$  (66). IRF3 activation is the result of its C-terminal phosphorylation, dimerization, and nuclear translocation. However, these steps are essential but not sufficient for transcriptional activation (67–69), and additional events, for example, coactivator recruitment, are required for optimal IRF3 transcription.  $\beta$ -Catenin has recently been suggested to act as a coactivator of IRF3, allowing the recruitment of the acetyltransferases CBP/p300 (7–9). However, none of these studies addressed



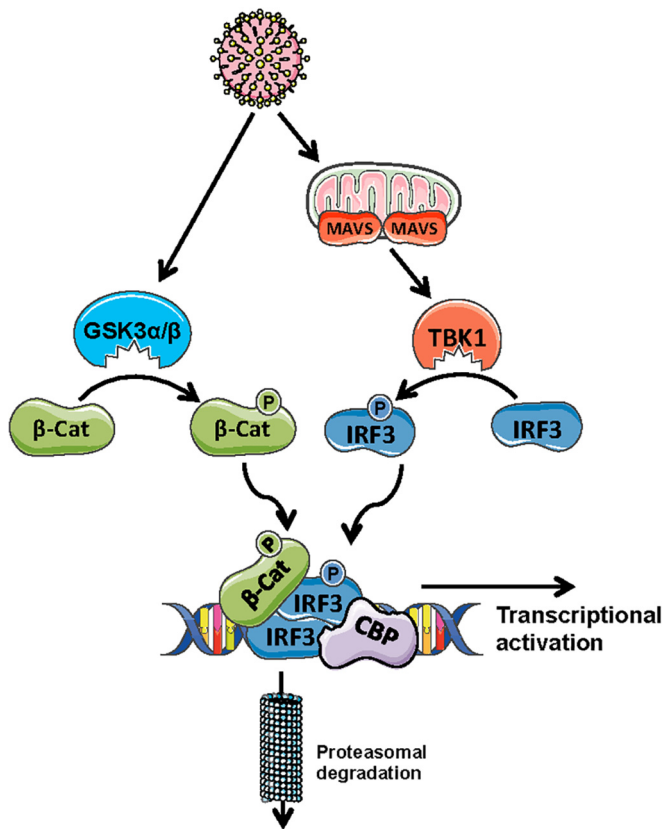
**FIG 6** Deletion of the phosphodegron motif of  $\beta$ -catenin decreases the DNA binding activity of IRF3 and the antiviral innate immune response following SeV infection. (A to C) Exon 3 of the mouse  $\beta$ -catenin gene was deleted from  $CATNB^{ex3-fllox/fllox/+}$  MEFs by the expression of Cre recombinase as described in Materials and Methods. (A) WCEs were subjected to immunoblot analysis with the antibodies indicated. (B) WCEs were assayed for IRF3 DNA binding activity by EMSA 8 h after SeV infection. The same cellular extracts were also used for immunoblot (Western blot [WB]) analysis with the antibodies indicated. (C) RNA was extracted from cells left uninfected or infected with SeV for 8 h and analyzed by RT-qPCR with primers for the genes indicated. Expression of the mRNA for each gene is presented relative to that in SeV-infected MEFs that do not express Cre. (D) Cells were infected with VSV-M51R-GFP at an MOI of 10, and monolayers were examined and photographed with an inverted fluorescence microscope at 16 h postinfection. One representative experiment out of two independent experiments with similar results is shown. FL, fluorescent; BF, bright field. (E) VSV-M51R-GFP infection at the MOI indicated was determined by quantifying the percentage of GFP-positive cells by flow cytometry. The data shown were pooled from two independent experiments and are relative to those obtained with Ad(RDG)-CMV-Luc treated cells. One representative experiment out of three independent experiments with similar results is shown. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .



**FIG 7** SeV infection induces the interaction between p- $\beta$ -catenin and IRF3, as well as their recruitment to the ISG56 gene promoter. ES cells (A) and HEC-1-B (B, C) and primary MRC-5 (D) fibroblasts were left uninfected or infected with SeV for the times indicated. (A, B) Whole-cell lysates were subjected to immunoblot analysis with the antibodies indicated. (C, D) Whole-cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with IRF3 (FL-425) antibody, followed by immunoblot analysis with the antibodies indicated. NR, nonrelevant. (E) HeLa cells were incubated with DMSO and a specific GSK-3 inhibitor ( $2 \mu\text{M}$  BIO-ac) for 2 h, followed by SeV for 8 h in the continuous presence of inhibitors. (F) HEK 293T cells were cotransfected with pGL3-TOPFlash (40 ng of each) along with pRL-TK (10 ng) and the plasmids indicated. On the next day, relative luciferase activity was measured as described in Materials and Methods. (G) HEK 293T cells were transfected with WT and exon 3A mutant FLAG- $\beta$ -catenin, and on the next day, cells were left uninfected or infected with SeV for 6 h. (E, G) IRF3 or  $\beta$ -catenin recruitment to the ISG56 gene promoter was determined by ChIP assay with the antibodies indicated. A qPCR assay was used to detect DNA recovered from antibody-bound chromatin segments as described in Materials and Methods. The data shown are relative to those obtained with DMSO-treated or mock-infected cells. Mean values  $\pm$  the standard deviations of triplicates are shown. ns, not significant; \*\*\*,  $P < 0.001$ . These results are representative of at least three independent experiments with similar results.

the state of  $\beta$ -catenin phosphorylation at S33/S37/T41 (GSK-3 consensus sites) or the role of GSK-3 in this precise context. Here, we propose that activation of GSK-3 during viral infection results in increased phosphorylation of  $\beta$ -catenin at S33/S37/T41 and recruitment of p- $\beta$ -catenin to IRF3, which likely acts as a coactivator of IRF3 DNA binding (Fig. 8). (i) Indeed, inhibition of GSK-3 kinase activity abrogated the induction of IRF3-regulated

genes and IRF3 promoter recruitment without affecting its activation. (ii) In addition to the fact that  $\beta$ -catenin was shown to accumulate in the nuclear compartment in response to infection (8, 38), we further show that GSK-3-phosphorylated  $\beta$ -catenin is enriched in IRF3-CBP immunocomplexes following virus infection. (iii) Phosphodeficient mutant  $\beta$ -catenin lost the ability to associate with the ISG56 gene promoter following virus infection.



**FIG 8** Model representing the implication of the GSK-3/β-catenin axis in IRF3-regulated RLR-dependent antiviral innate immunity. Virus infection activates TBK1 through MAVS, leading to IRF3 phosphorylation. In addition, it activates GSK-3 to phosphorylate β-catenin, which in turn is recruited to the IRF3 holocomplex for optimal DNA binding of IRF3 and activation of antiviral genes. The model was created with Servier Medical Art templates licensed under a CC BY 3.0 license.

(iv) Lack of p-β-catenin in DKO cells complemented with a kinase-dead form of either GSK-3α or GSK-3β correlates with abrogated DNA binding of IRF3 and decreased antiviral mRNA induction. (v) Expression of β-catenin lacking GSK-3 phosphorylation sites (or the so-called phosphodegron motif) demonstrated a decrease in IRF3 DNA binding activity affecting the induction of representative IRF3-regulated genes and reducing the establishment of a functional antiviral state following virus infection. Thus, our data suggest a positive role for β-catenin phosphorylated at S33/S37/T41 in antiviral innate immunity. Accordingly, a negative role for dephosphorylated active β-catenin in the innate immune response has also been shown (38). Recent studies have proposed models where histone deacetylase 6-mediated deacetylation of β-catenin is required for its nuclear accumulation upon infection (8, 9). Our study provides another layer of regulation where fine-tuning of the RLR/IRF3-mediated antiviral response is also dependent on the phosphorylation of β-catenin by GSK-3 isoforms. As GSK-3 is considered a negative regulator of β-catenin (16), we believe that our study reconciles this apparent paradox by demonstrating a role for GSK-3-phosphorylated β-catenin in RLR signaling.

Although we show that a fraction of N-terminally phosphorylated β-catenin interacts with IRF3, the sequence of events is not

known yet. Indeed, β-catenin could be phosphorylated after its recruitment to IRF3 by nuclear GSK-3 or a fraction of phosphorylated β-catenin could be freed from the destruction complex by activated IRF3, allowing their translocation to the nucleus. Our unpublished observation of GSK-3 and IRF3 interaction supports these scenarios. As S33/S37/T41 phosphorylation leads to the eventual degradation of β-catenin, it is possible that IRF3 interaction with the phosphorylated form of β-catenin sequesters it from being recognized by the E3 ubiquitin ligase β-TrCP. A role for β-catenin phosphorylation at S33/S37/T41 in antiviral innate immunity is not unexpected. Recently, β-catenin phosphorylation by GSK-3 has emerged as a mechanism through which GSK-3 exerts effects on multiple cellular processes, including mitosis (70, 71), cell migration (72), neuroepithelial integrity (73), and neuronal excitability (74). Phosphorylation of β-catenin at Ser552 in response to VSV infection was previously reported (7); however, we did not observe any increase in the basal signal level at this phosphorylation site following SeV infection in a previous study (38).

Increased phosphorylation of β-catenin at S33/S37/T41 (Fig. 7A and B) and glycogen synthase at S641 (data not shown) following viral infection is indicative of increased GSK-3 kinase activity. Through the use of immunocomplex *in vitro* kinase assays, we have also observed an increase in the phosphotransferase activity of GSK-3 following virus infection (data not shown). In addition to SeV, activation of GSK-3 during infection with coxsackievirus, an RNA virus (75), and in response to HIV-1 Tat protein (76) has previously been reported. However, it is still unknown how GSK-3 becomes activated following virus infection. We did not observe any changes in the level of T-loop tyrosine phosphorylation (Tyr279 in GSK-3α and Tyr216 in GSK-3β) following SeV infection (Fig. 3C). Several alternative scenarios are possible, including the inhibition of kinases such as V-Akt (from the murine thymoma viral oncogene; AKT) and p90 ribosomal S6 kinase (RSK; data not shown), as well as Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase cyclic-AMP-dependent protein kinase (CAMKII), and p70 S6 kinase (13, 77), that target negative phosphoacceptor sites Ser9 and Ser21 in the N-terminal domain of GSK-3. Phosphatases PP1 and PP2A could also be involved (78), considering the ability of IRF3 to interact with both of them (79, 80) and GSK-3 (data not shown). As GSK-3 is important for the induction of an antiviral immune response, it is likely that it is a target of viral proteins. The NS5A protein of hepatitis C virus (81, 82), the hepatitis B virus X protein (83), Epstein-Barr virus (84), and the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (85) have been reported to inhibit GSK-3 and lead to the stabilization of unphosphorylated β-catenin. The utilization of GSK-3 by the innate immune system is not surprising, as this kinase is constitutively active and thus no other intermediate steps are required before its utilization in rapid innate immune responses.

Altogether, our results suggest that GSK-3 activates the antiviral innate immune response in part through phosphorylation of the phosphodegron motif of β-catenin, which regulates subsequent IRF3-DNA binding and gene expression.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.J.S. (MOP-84571) and J.R.W. (MOP-74711). M.J.S. holds Canada Research chairs in inflammatory response signaling. K.A.K. received a postdoctoral fellowship from the Groupe de

Recherche Universitaire sur le Médicament. A.M. is a recipient of scholarships from the CIHR and the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

We are grateful to Christophe Frémin for technical assistance.

## REFERENCES

- Iwasaki A. 2012. A virological view of innate immune recognition. *Annu Rev Microbiol* 66:177–196. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150203>.
- Unterholzner L. 2013. The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors? *Immunobiology* 218:1312–1321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.07.007>.
- Yoneyama M, Fujita T. 2010. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol* 20:4–22. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.633>.
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4:491–496. <http://dx.doi.org/10.1038/ni921>.
- Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300:1148–1151. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1081315>.
- Suhara W, Yoneyama M, Kitabayashi I, Fujita T. 2002. Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* 277:22304–22313. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M200192200>.
- Yang P, An H, Liu X, Wen M, Zheng Y, Rui Y, Cao X. 2010. The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol* 11:487–494. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1876>.
- Zhu J, Coyne CB, Sarkar SN. 2011. PKC alpha regulates Sendai virus-mediated interferon induction through HDAC6 and beta-catenin. *EMBO J* 30:4838–4849. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.351>.
- Chattopadhyay S, Fensterl V, Zhang Y, Velezparambil M, Wetzel JL, Sen GC. 2013. Inhibition of viral pathogenesis and promotion of the septic shock response to bacterial infection by IRF-3 are regulated by the acetylation and phosphorylation of its coactivators. *mBio* 4(2):e00636–12.
- Hiscott J, Grandvaux N, Sharma S, Tenover BR, Servant MJ, Lin R. 2003. Convergence of the NF-kappaB and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1010:237–248. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1299.042>.
- Servant MJ, Grandvaux N, tenOever BR, Duguay D, Lin R, Hiscott J. 2003. Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 278:9441–9447. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209851200>.
- Woodgett JR. 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 9:2431–2438.
- Kaidanovich-Belil O, Woodgett JR. 2011. GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. *Front Mol Neurosci* 4:40.
- Sutherland C. 2011. What are the bona fide GSK3 substrates? *Int J Alzheimers Dis* 2011:505607.
- Stamos JL, Weis WI. 2013. The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a007898. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a007898>.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837–847. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00685-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00685-2).
- Mbom BC, Nelson WJ, Barth A. 2013. β-Catenin at the centrosome: discrete pools of β-catenin communicate during mitosis and may coordinate centrosome functions and cell cycle progression. *Bioessays* 35:804–809. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201300045>.
- Valenta T, Hausmann G, Basler K. 2012. The many faces and functions of β-catenin. *EMBO J* 31:2714–2736. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.150>.
- Doble BW, Patel S, Wood GA, Kockeritz LK, Woodgett JR. 2007. Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell* 12:957–971. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.001>.
- Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh JC, He X. 2008. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135:367–375.
- Itoh S, Saito T, Hirata M, Ushita M, Ikeda T, Woodgett JR, Algul H, Schmid RM, Chung UI, Kawaguchi H. 2012. GSK-3alpha and GSK-3beta proteins are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation. *J Biol Chem* 287:29227–29236. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.372086>.
- Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somerville TC, Cleary ML. 2008. Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature* 455:1205–1209. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07284>.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406:86–90. <http://dx.doi.org/10.1038/35017574>.
- Kerkela R, Kockeritz L, Macaulay K, Zhou J, Doble BW, Beaum C, Greytak S, Woulfe K, Trivedi CM, Woodgett JR, Epstein JA, Force T, Huggins GS. 2008. Deletion of GSK-3beta in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation. *J Clin Invest* 118:3609–3618. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI36245>.
- MacAulay K, Doble BW, Patel S, Hansotia T, Sinclair EM, Drucker DJ, Nagy A, Woodgett JR. 2007. Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab* 6:329–337. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.013>.
- Cheng H, Woodgett J, Maamari M, Force T. 2011. Targeting GSK-3 family members in the heart: a very sharp double-edged sword. *J Mol Cell Cardiol* 51:607–613. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.11.020>.
- Patel S, Doble BW, MacAulay K, Sinclair EM, Drucker DJ, Woodgett JR. 2008. Tissue-specific role of glycogen synthase kinase 3beta in glucose homeostasis and insulin action. *Mol Cell Biol* 28:6314–6328. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00763-08>.
- Force T, Woodgett JR. 2009. Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. *J Biol Chem* 284:9643–9647. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R800077200>.
- Woodgett JR. 2012. Can a two-faced kinase be exploited for osteosarcoma? *J Natl Cancer Inst* 104:722–723. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djs223>.
- Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. 2005. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 6:777–784. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1221>.
- Beurel E, Michalek SM, Jope RS. 2010. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol* 31:24–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.09.007>.
- Wang H, Garcia CA, Rehani K, Cekic C, Alard P, Kinane DF, Mitchell T, Martin M. 2008. IFN-beta production by TLR4-stimulated innate immune cells is negatively regulated by GSK3-beta. *J Immunol* 181:6797–6802. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6797>.
- Wang JT, Chang LS, Chen CJ, Doong SL, Chang CW, Chen MR. 2014. Glycogen synthase kinase 3 negatively regulates IFN regulatory factor 3 transactivation through phosphorylation at its linker region. *Innate Immun* 20:78–87. <http://dx.doi.org/10.1177/1753425913485307>.
- Lei CQ, Zhong B, Zhang Y, Zhang J, Wang S, Shu HB. 2010. Glycogen synthase kinase 3beta regulates IRF3 transcription factor-mediated antiviral response via activation of the kinase TBK1. *Immunity* 33:878–889. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.021>.
- van Zuylen WJ, Doyon P, Clément JF, Khan KA, D'Ambrosio LM, Do F, St-Amant-Verret M, Wissanji T, Emery G, Gingras AC, Meloche S, Servant MJ. 2012. Proteomic profiling of the TRAF3 interactome network reveals a new role for the ER-to-Golgi transport compartments in innate immunity. *PLoS Pathog* 8:e1002747. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002747>.
- Kelly KF, Ng DY, Jayakumar G, Wood GA, Koide H, Doble BW. 2011. β-Catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism. *Cell Stem Cell* 8:214–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.010>.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72:8463–8471.
- Baril M, Es-Saad S, Chatel-Chaix L, Fink K, Pham T, Raymond VA, Audette K, Guenier AS, Duchaine J, Servant M, Bilodeau M, Cohen E, Grandvaux N, Lamarre D. 2013. Genome-wide RNAi screen reveals a new role of the WNT/CTNBB1 signaling pathway as negative regulator of

- virus-induced innate immune responses. *PLoS Pathog* 9:e1003416. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003416>.
39. Khan KA, Coquette A, Davrinche C, Herbein G. 2009. Bcl-3-regulated transcription from major immediate-early promoter of human cytomegalovirus in monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 182:7784–7794. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803800>.
  40. Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, Forman J, Chen ZJ. 2006. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 24:633–642. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.004>.
  41. Gravel SP, Servant MJ. 2005. Roles of an I $\kappa$ B kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *J Biol Chem* 280:7477–7486. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M410392200>.
  42. Preston CM, Harman AN, Nicholl MJ. 2001. Activation of interferon response factor-3 in human cells infected with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus. *J Virol* 75:8909–8916. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.19.8909-8916.2001>.
  43. Gaillard C, Strauss F. 1990. Nucleic acid precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res* 18:378. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/18.2.378>.
  44. Andersen J, VanScoy S, Cheng TF, Gomez D, Reich NC. 2008. IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. *Genes Immun* 9:168–175. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gene.6364449>.
  45. Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, Shum B, Hacohen N, Chen ZJ, Whelan SP, Franssen M, Nibert ML, Superti-Furga G, Kagan JC. 2010. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* 141:668–681. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.018>.
  46. Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, Lin R, Hiscott J. 2002. Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* 76:5532–5539. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.11.5532-5539.2002>.
  47. Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, Paterson JM, Power AT, Knowles S, Marius R, Reynard J, Poliquin L, Atkins H, Brown EG, Durbin RK, Durbin JE, Hiscott J, Bell JC. 2003. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4:263–275. [http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00241-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00241-1).
  48. Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P. 2003. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol* 10:1255–1266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.11.010>.
  49. Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408:297–315. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20070797>.
  50. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H. 1997. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene *dTCF*. *Cell* 88:789–799. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81925-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81925-X).
  51. Buescher JL, Phiel CJ. 2010. A noncatalytic domain of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is essential for activity. *J Biol Chem* 285:7957–7963. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.091603>.
  52. Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J. 1998. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 18:2986–2996.
  53. Soulat D, Burckstummer T, Westermayer S, Goncalves A, Bauch A, Stefanovic A, Hantschel O, Bennett KL, Decker T, Superti-Furga G. 2008. The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. *EMBO J* 27:2135–2146. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.126>.
  54. Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M, Taketo MM. 1999. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J* 18:5931–5942. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.21.5931>.
  55. Wrobel CN, Mutch CA, Swaminathan S, Taketo MM, Chenn A. 2007. Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev Biol* 309:285–297. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.013>.
  56. Wathel MG, Clauss IM, Content J, Huez GA. 1988. Regulation of two interferon-inducible human genes by interferon, poly(rI).poly(rC) and viruses. *Eur J Biochem* 174:323–329. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14101.x>.
  57. Pan JQ, Lewis MC, Ketterman JK, Clore EL, Riley M, Richards KR, Berry-Scott E, Liu X, Wagner FF, Holson EB, Neve RL, Biechele TL, Moon RT, Scolnick EM, Petryshen TL, Haggarty SJ. 2011. AKT kinase activity is required for lithium to modulate mood-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* 36:1397–1411. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2011.24>.
  58. Schroeder JH, Bell LS, Janas ML, Turner M. 2013. Pharmacological inhibition of glycogen synthase kinase 3 regulates T cell development in vitro. *PLoS One* 8:e58501. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058501>.
  59. Sun M, Meares G, Song L, Joje RS. 2009. XIAP associates with GSK3 and inhibits the promotion of intrinsic apoptotic signaling by GSK3. *Cell Signal* 21:1857–1865. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.08.002>.
  60. Wang R, Wang Y, Liu N, Ren C, Jiang C, Zhang K, Yu S, Chen Y, Tang H, Deng Q, Fu C, Wang Y, Li R, Liu M, Pan W, Wang P. 2013. FBW7 regulates endothelial functions by targeting KLF2 for ubiquitination and degradation. *Cell Res* 23:803–819. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.42>.
  61. Sumi T, Oki S, Kitajima K, Meno C. 2013. Epiblast ground state is controlled by canonical Wnt/beta-catenin signaling in the postimplantation mouse embryo and epiblast stem cells. *PLoS One* 8:e63378. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063378>.
  62. Chen L, Salinas GD, Li X. 2009. Regulation of serotonin 1B receptor by glycogen synthase kinase-3. *Mol Pharmacol* 76:1150–1161. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.109.056994>.
  63. Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, Vijayakumar S, Economides AN, Aaronson SA. 2010. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* 24:2517–2530. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1957710>.
  64. Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H. 2008. Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development* 135:2969–2979. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.021121>.
  65. Ford E, Thanos D. 2010. The transcriptional code of human IFN-beta gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1799:328–336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.01.010>.
  66. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T. 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13:539–548. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00053-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00053-4).
  67. Clément JF, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Grandvaux N, Bonneil E, Thibault P, Meloche S, Servant MJ. 2008. Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *J Virol* 82:3984–3996. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02526-07>.
  68. Sarkar SN, Peters KL, Elco CP, Sakamoto S, Pal S, Sen GC. 2004. Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol* 11:1060–1067. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb847>.
  69. Noyce RS, Collins SE, Mossman KL. 2009. Differential modification of interferon regulatory factor 3 following virus particle entry. *J Virol* 83:4013–4022. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02069-08>.
  70. Hadjihannas MV, Bruckner M, Behrens J. 2010. Conductin/axin2 and Wnt signalling regulates centrosome cohesion. *EMBO Rep* 11:317–324. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2010.23>.
  71. Huang P, Senga T, Hamaguchi M. 2007. A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene* 26:4357–4371. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210217>.
  72. Faux MC, Coates JL, Kershaw NJ, Layton MJ, Burgess AW. 2010. Independent interactions of phosphorylated beta-catenin with E-cadherin at cell-cell contacts and APC at cell protrusions. *PLoS One* 5:e14127. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014127>.
  73. Chilov D, Sinjushina N, Rita H, Taketo MM, Makela TP, Partanen J. 2011. Phosphorylated beta-catenin localizes to centrosomes of neuronal progenitors and is required for cell polarity and neurogenesis in developing midbrain. *Dev Biol* 357:259–268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.06.029>.
  74. Tapia M, Del Puerto A, Puime A, Sanchez-Ponce D, Fronzaroli-Molinieres L, Pallas-Bazarrá N, Carlier E, Giraud P, Debanne D, Wan-

- dosell F, Garrido JJ. 2013. GSK3 and beta-catenin determines [sic] functional expression of sodium channels at the axon initial segment. *Cell Mol Life Sci* 70:105–120. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-1059-5>.
75. Yuan J, Zhang J, Wong BW, Si X, Wong J, Yang D, Luo H. 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  suppresses coxsackievirus-induced cytopathic effect and apoptosis via stabilization of beta-catenin. *Cell Death Differ* 12:1097–1106. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401652>.
  76. Maggjarwar SB, Tong N, Ramirez S, Gelbard HA, Dewhurst S. 1999. HIV-1 Tat-mediated activation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  contributes to Tat-mediated neurotoxicity. *J Neurochem* 73:578–586.
  77. Song B, Lai B, Zheng Z, Zhang Y, Luo J, Wang C, Chen Y, Woodgett JR, Li M. 2010. Inhibitory phosphorylation of GSK-3 by CaMKII couples depolarization to neuronal survival. *J Biol Chem* 285:41122–41134. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.130351>.
  78. Hernández F, Langa E, Cuadros R, Avila J, Villanueva N. 2010. Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biochem* 344:211–215. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0544-0>.
  79. Long L, Deng Y, Yao F, Guan D, Feng Y, Jiang H, Li X, Hu P, Lu X, Wang H, Li J, Gao X, Xie D. 2014. Recruitment of phosphatase PP2A by RACK1 adaptor protein deactivates transcription factor IRF3 and limits type I interferon signaling. *Immunity* 40:515–529. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.015>.
  80. Gu M, Zhang T, Lin W, Liu Z, Wang X. 2014. Protein phosphatase PP1 negatively regulates the Toll-like receptor- and RIG-I-like receptor-triggered production of type I interferon by inhibiting IRF3 phosphorylation at serines 396 and 385 in macrophage. *Cell Signal* 26:2930–2939. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.09.007>.
  81. Park CY, Choi SH, Kang SM, Kang JI, Ahn BY, Kim H, Jung G, Choi KY, Hwang SB. 2009. Nonstructural 5A protein activates beta-catenin signaling cascades: implication of hepatitis C virus-induced liver pathogenesis. *J Hepatol* 51:853–864. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2009.06.026>.
  82. Street A, Macdonald A, McCormick C, Harris M. 2005. Hepatitis C virus NS5A-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase results in stabilization of cellular beta-catenin and stimulation of beta-catenin-responsive transcription. *J Virol* 79:5006–5016. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.8.5006-5016.2005>.
  83. Srisuttee R, Koh SS, Kim SJ, Malilas W, Boonying W, Cho IR, Jhun BH, Ito M, Horio Y, Seto E, Oh S, Chung YH. 2012. Hepatitis B virus X (HBX) protein upregulates beta-catenin in a human hepatic cell line by sequestering SIRT1 deacetylase. *Oncol Rep* 28:276–282.
  84. Everly DN, Jr, Kusano S, Raab-Traub N. 2004. Accumulation of cytoplasmic beta-catenin and nuclear glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 78:11648–11655. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.21.11648-11655.2004>.
  85. Fujimuro M, Wu FY, ApRhys C, Kajumbula H, Young DB, Hayward GS, Hayward SD. 2003. A novel viral mechanism for dysregulation of beta-catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *Nat Med* 9:300–306. <http://dx.doi.org/10.1038/nm829>.