

Université de Montréal

**Caractérisation de l'activité transcriptionnelle antivirale et
immunorégulatrice dépendante de STAT2 et IRF9, mais
indépendante de STAT1, induite par la
costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$**

Par Mélissa Mariani

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. SC.)
en Sciences Biomédicales

Avril 2016

© Mélissa Mariani, 2016

Résumé

Les cellules épithéliales pulmonaires constituent la première ligne de défense face aux virus respiratoires via la sécrétion de mucus, de peptides, de cytokines et chimiokines qui déterminent l'élimination ou la progression de l'infection. Les principales cytokines antivirales produites par les cellules épithéliales alvéolaires (AEC) sont les interférons (IFN) type I (α/β) et III (λ). La liaison d'IFN β à son récepteur induit une voie antivirale bien caractérisée qui aboutit à l'activation du complexe ISGF3 (STAT1, STAT2 et IRF9) qui permet la transcription de multiples gènes codant pour des protéines à activité antivirale et immunorégulatrice. Il a récemment été démontré que la costimulation des cellules épithéliales pulmonaires par l'IFN β et le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α), également produit lors d'une infection, synergisent pour induire un état antiviral tardif distinct. D'autre part, il a été montré que la synergie entre le TNF α et l'IFN β induit une voie de signalisation impliquant STAT2 et IRF9, mais indépendante de STAT1 permettant l'expression du gène *DUOX2*. Notre but est de déterminer l'importance de cette nouvelle voie de signalisation induite par la costimulation du TNF α +IFN β , impliquant STAT2 et IRF9 indépendamment de STAT1 dans la régulation d'un programme transcriptionnel antiviral et immunorégulateur tardif.

Notre premier objectif est de déterminer si des gènes antiviraux et immunorégulateurs qui sont induits par la costimulation par TNF α +IFN β sont dépendants de la voie STAT2/IRF9, indépendamment de STAT1. En utilisant la technique de qRT-PCR, nous avons identifié 3 gènes immunorégulateurs, *CXCL10*, *IDO* et *APOBEC3G*, induits de manière synergique en réponse à TNF α +IFN β dans les cellules A549, un modèle de cellules épithéliales pulmonaires. Afin de confirmer que ces gènes sont induits indépendamment de STAT1, nous avons validé leur expression dans la lignée cellulaire U3A déficiente en STAT1. Par l'utilisation d'ARN interférants (ARNi) dirigés contre STAT2 et IRF9, nous avons confirmé que l'induction de ces gènes est dépendante de STAT2 et IRF9. Finalement, l'analyse de l'activité du promoteur de *CXCL10* en réponse à TNF α +IFN β par des essais

rapporteurs luciférase a permis de montrer que la régulation se fait au niveau transcriptionnel.

Notre deuxième objectif, est de déterminer si STAT6 pourrait remplacer STAT1 dans la voie de signalisation induite par $TNF\alpha+IFN\beta$. En effet, STAT6 est un inducteur connu de l'expression de *DUOX2* en réponse à IL4+IL13. Contrairement à notre hypothèse, l'inhibition de STAT6 par ARNi augmente l'expression de *DUOX2* en réponse à $TNF\alpha+IFN\beta$ suggérant que STAT6 est un régulateur négatif.

Nos résultats ont permis de comprendre de manière plus détaillée les mécanismes mis en place dans le développement d'une réponse antivirale. D'autre part, l'étude de l'effet de l' $IFN\beta$ et du $TNF\alpha$ est également pertinente pour les maladies chroniques inflammatoires et autoimmunes. De plus, nos résultats illustrent un nouveau paradigme concernant les mécanismes de signalisation cellulaire impliqués dans la synergie entre deux cytokines qui pourrait être applicable à des combinaisons de cytokines autres que $TNF\alpha+IFN\beta$.

Mots-clés: Cytokines, Synergie, $TNF\alpha$, $IFN\beta$, Réponse antivirale

Abstract

Lung epithelial cells are the first line of defense against respiratory viruses via mucus secretion, peptides, cytokines and chemokines that determine the progression of the infection. The main antiviral cytokines produced by alveolar epithelial cells (AEC) are the interferons (IFN) type I (α / β) and III (λ). IFN β binding to its receptor induces an antiviral pathway that is well characterized and leads to activation of the ISGF3 complex (STAT1, STAT2 and IRF9) which allows the transcription of multiple genes encoding proteins with antiviral and immunoregulatory activity. It has recently been shown that the costimulation of lung epithelial cells by IFN β and Tumor Necrosis Factor α (TNF α), also produced during infection, induces a separate and late antiviral state, through synergy. On the other hand, it has been shown that the synergy between IFN β +TNF α induces a signaling pathway involving STAT2 and IRF9 independently of STAT1 permitting the expression of the *DUOX2* gene. Our goal is to determine the importance of this new signaling pathway induced by costimulation of TNF α +IFN β involving STAT2 and IRF9 regardless of STAT1 in regulating the antiviral immunoregulatory and late transcriptional program.

Our first objective is to determine whether antiviral and immunomodulatory genes that are induced by costimulation TNF α +IFN β are dependent on the STAT2/IRF9 way, independent of STAT1. Using the technique of qRT-PCR, we identified 3 immunoregulatory genes, *CXCL10*, *IDO* and *APOBEC3G*, synergistically induced in response to TNF α +IFN β in A549 cells, a model of pulmonary epithelial cells. To confirm that these genes are induced independently of STAT1, we validated their expression in the STAT1 deficient cell line, U3A. By the use of interfering RNA (siRNA) directed against STAT2 and IRF9, we confirmed that the induction of these genes is dependent STAT2 and IRF9. Finally, the analysis of the activity of *CXCL10* promoter in response to TNF α +IFN β by luciferase reporter assays has shown that the regulation is at the transcriptional level.

Our second objective is to determine whether STAT6 could replace the STAT1 in the signaling pathway induced by TNF α +IFN β . Indeed, STAT6 is a known inducer of the

expression of *DUOX2* in response to IL4+IL13. Contrarily to our hypothesis, inhibition of STAT6 by RNAi increases the expression of *DUOX2* in response to TNF α +IFN β suggesting that STAT6 is a negative regulator.

Our results allow the understanding of the mechanisms in the development of an antiviral response in more detail. On the other hand, the study of the effect of IFN β and TNF α is also relevant for chronic inflammatory and autoimmune diseases. In addition, our results illustrate a new paradigm for cell signaling mechanisms involved in the synergy between two cytokines that may be applicable to combinations of cytokines other than TNF α +IFN β .

Keywords: Cytokines, Synergy, TNF α , IFN β , Antiviral response

Table des matières

Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1: Introduction.....	1
1.1.0 Défense immunitaire.....	2
1.1.1 L'immunité innée.....	2
1.1.2 L'immunité adaptative	3
1.1.3 La communication entre l'immunité innée et adaptative par les cytokines et chimiokines.....	6
1.2.0 Les cellules épithéliales, la première barrière physique	9
1.2.1 En réponse à une infection virale, les cellules épithéliales des voies aériennes induisent un état antiviral par l'expression de cytokines.....	11
1.3.0 L'induction de la voie JAK/STAT par les IFN.....	13
1.3.1 Voies de signalisations indépendantes de STAT1	17
1.4.0 Actions synergiques entre cytokines.....	17
.....	19
.....	19
Hypothèse et objectifs de travail.....	20
Chapitre 2: Matériels et méthodes	23

Chapitre 3: Résultats	34
3.1.0 Déterminer l'importance de la voie de signalisation dépendante de STAT2 et IRF9, indépendamment de STAT1, dans la régulation d'un programme transcriptionnel antiviral et immunorégulateur en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β	35
3.1.1 Profil d'expression de gènes immunorégulateurs et antiviraux en réponse à TNF α , IFN β ou à TNF α +IFN β	36
3.1.2 Analyse de l'expression des gènes induits de manière synergique en réponse à TNF α +IFN β dans des cellules déficientes en STAT1.	40
3.1.2.1 Validation du modèle de cellules U3A	40
3.1.2.2 Analyse de l'expression de <i>CXCL10</i> , <i>APOBEC3G</i> et <i>IDO</i> en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β dans les cellules U3A.....	41
3.1.2.3 Étude du rôle de STAT2 et IRF9 dans l'expression de <i>CXCL10</i> et <i>APOBEC3G</i> en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β dans les cellules déficientes en STAT1	44
3.1.2.4 Déterminer si l'induction synergique en réponse à TNF α +IFN β implique une régulation transcriptionnelle des gènes antiviraux et immunorégulateurs	47
3.2.0 Est-ce que STAT6, qui est un régulateur connu de <i>DUOX2</i> en réponse à IL4+IL13, est impliqué dans l'induction de <i>DUOX2</i> en réponse à la costimulation par TNF α + IFN β ?	52
3.2.1 Déterminer le rôle de STAT6 dans la voie de signalisation induite par le TNF α +IFN β	52
3.2.2 Déterminer le rôle de STAT6 dans la régulation de <i>DUOX2</i> dans le contexte d'une infection virale par SeV.....	56
3.2.3 Cinétique de la phosphorylation de STAT6 dans le contexte d'une costimulation par TNF α +IFN β et d'une infection SeV	58
Chapitre 4: Discussion	60

4.1.0	La voie de signalisation dépendante de STAT2/IRF9, mais indépendante de STAT1, contrôle un programme transcriptionnel antiviral et immunorégulateur induit par l'action synergique entre TNF α et IFN β	64
4.1.1:	Mécanismes de synergie impliqués dans la régulation des gènes induits par TNF α +IFN β	65
4.1.2	L'induction synergistique des gènes antiviraux et immunorégulateurs en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β implique une régulation transcriptionnelle	68
4.1.3:	Mécanismes possibles de l'induction tardive des gènes en réponse à TNF α +IFN β	69
4.1.4:	Mécanismes antiviraux indépendants de STAT1.	70
4.2.0	STAT6, un régulateur négatif de <i>DUOX2</i> dans la voie de signalisation induite en réponse au TNF α +IFN β	72
Chapitre 5: Conclusion et perspectives.....		76
Articles scientifiques.....		i

Liste des tableaux

Tableau 1: Rôles et fonctions des principales cytokines impliquées dans la réponse immunitaire. [110–113].	7
Tableau 2: Rôles et voies de signalisation des cytokines produites lors de la réponse immunitaire des cellules épithéliales des voies aériennes [115–120].	12
Tableau 3: Exemples d'ISG produits lors de la réponse immunitaire des cellules épithéliales des voies aériennes [35].	16
Tableau 4: Séquences d'ARNi utilisés dans notre étude	26
Tableau 5: Anticorps utilisés dans notre étude	29
Tableau 6: Conditions d'utilisation des différentes amorces dans la réaction de PCR quantitative de type SYBR Green	32

Liste des figures

Figure 1-1: Schéma du système immunitaire inné et adaptatif.....	5
Figure 1-1.3: Communication entre le système immunitaire inné et adaptatif par les cytokines	8
Figure 1-2.0: La sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales pulmonaires, une première barrière physique.	10
Figure 1-3.0: Voie de signalisation induite par l'IFN β / λ	15
Figure 1-4.0 : Mécanisme de la synergie des cytokines antivirales.....	19
Figure 3-1.1: Gènes immunorégulateurs et antiviraux induits par TNF α seul, IFN β seul ou par l'action synergique du TNF α +IFN β	38
Figure 3-1.1.1: Diagramme de Venn représentant la classification d'induction de <i>Mx1</i> , <i>PKR</i> , <i>NOD2</i> , <i>IRF1</i> , <i>IDO</i> , <i>DUOX2</i> , <i>APOBEC3G</i> et <i>CXCL10</i> en fonction de la réponse à la stimulation des cellules A549 par le TNF α seul, par l'IFN β seul ou par TNF α +IFN β	39
Figure 3-1.2.1: <i>CXCL10</i> et <i>APOBEC3G</i> sont induits par la costimulation du TNF α +IFN β , indépendamment de STAT1	43
Figure 3-1.2.3: L'expression de <i>APOBEC3G</i> et de <i>CXCL10</i> , est dépendante de la voie de signalisation STAT2/IRF9	46
Figure 3-1.2.4: Schéma des constructions du promoteur de <i>CXCL10</i> utilisées dans notre étude.....	50
Figure 3-1.2.4.1: L'activité transcriptionnelle du promoteur de <i>CXCL10</i> induite par TNF α +IFN β implique les séquences de liaison ISRE(3), NF κ B(1) et NF κ B(2).	51
Figure 3-2.1: Analyse du rôle de STAT6 dans la voie de signalisation induite en réponse à la costimulation du TNF α +IFN β	55
Figure 3-2.2: STAT6, un régulateur négatif de l'expression de <i>DUOX2</i> suite à une infection SeV	57
Figure 3-2.3: Cinétique de la phosphorylation de STAT6 suite à la costimulation avec du TNF α +IFN β ou à la suite d'une infection par SeV	59
Figure 4-1: Régulation de l'expression de <i>DUOX2</i> en réponse à TNF α +IFN β	62

Liste des abréviations

AEC : *Alveolar Epithelial Cells*

Ag: Antigène

APOBEC3G: *Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme Catalytic polypeptide-like 3G*

AP-1: *Activator Protein-1*

ARNdb: ARN double brin

ARNi: ARN interférant

ARNsb: ARN simple brin

Ac: Anticorps

BCR: *B-cell Receptor*

ChIP: Immunoprécipitation de la Chromatine

COX-2 : Cyclooxygénase-2

CPA: Cellule Présentatrice d'antigène

CTL: *Cytotoxic T lymphocyte*

CXCL10: *C-X-C motif chemokine 10*

DEN: Dengue

DUOX2: *Dual Oxydase 2*

eIF2: *Eukaryotic Initiation Factor 2*

FBS: Sérum Fétal de Bovin

HAU: *Hemagglutinine Units*

IB: Immunoblot

Ig: Immunoglobuline

IDO: *Indoleamine 2, 3-Dioxygenase*

IFNAR: *Interferon Receptor*

IFN: *Interferon*

IRF: *Interferon Regulatory Factor*

ISG: *Interferon-Stimulated Gene*

ISGF3 : *Interferon-Stimulated Genes Factor 3*

ISRE: *Interferon-Stimulated Response Element*

JAK: *Janus Kinase*

JNK: *Jun N-terminal Kinase*
LCMV: Chorioméningite Lymphocytaire
LPS: Lipopolysaccharide
NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen*
NF κ B: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*
NK: *Natural Killer*
NLR: *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptor*
NOD: *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*
Mx1: *Mx dynamin-like GTPase1*
PAMP: *Pathogen Associated Molecular Pattern*
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PKR: Protéine Kinase R
PRR: *Pattern Recognition Receptor*
RIG-I: *Retinoic acid-Inducible Gene 1*
RLR: *RIG-I-Like Receptor*
SeV: *Sendai Virus*
SMF: Milieu sans sérum
STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*
TCR: *T-Cell Receptor*
T_H: *Helper T cell*
TLR: *Toll-Like Receptor*
TNF: *Tumor Necrosis Factor*
TRADD: *TNFR-Associated with Death Domain*
TYK: *Tyrosine Kinase*
WCE: Extrait protéique cellulaire total

L'ambition est le chemin du succès. La persévérance est le véhicule dans lequel vous y arriverez. – Bill Bradley

Remerciements

Ce projet de maîtrise n'aurait pas été possible sans le soutien de certaines personnes. Je profite cette occasion pour vous souligner mes sentiments de gratitude.

Mes premiers remerciements vont d'abord à ma directrice de recherche, Dr Nathalie Grandvaux, qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a accompagnée tout au long de ma formation. Sa disponibilité et ses généreux secours au cours de certains de mes moments difficiles ont été d'une très grande aide. Les conseils m'ont permis de bien structurer mon étude et sa rigueur au travail est un exemple pour moi, merci infiniment.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury, Dr Christopher Rose, mon président rapporteur et Dr Caroline Gilbert, ma lectrice externe, d'avoir accepté de participer à ce jury.

Les membres de mon laboratoire ont été d'une très grande importance durant mon parcours académique. Audray, ma confidente et ma complice, mes journées au laboratoire ont été beaucoup plus agréables en ta compagnie. Élise, ta douceur est une qualité que j'ai beaucoup appréciée. Alexa, ta sagesse et tes conseils ont été pour moi très précieux. Sandra et Nathalia, vous êtes tellement amusantes, vous avez apporté de très belles couleurs au laboratoire. Je ne peux oublier Espérance, plusieurs soirées passées au laboratoire avec toi m'ont permis de découvrir une personne calme à qui je pouvais jaser de tout. Tu vas être une mère magnifique. Je vous remercie tous personnellement pour votre soutien.

Mes remerciements seraient incomplets si je ne fais pas mention d'une précieuse amie, Christine Tibolla, pour son dévouement et son perfectionnisme, qui m'ont été d'une très grande aide. Je tiens également à remercier mes ami(e)s et ma famille. J'ai souvent désisté aux invitations et malgré tout, vous m'avez toujours appuyée et supportée durant ce périple.

Merci,

Chapitre 1: Introduction

1.1.0 Défense immunitaire

Le système immunitaire permet de maintenir la cohérence des cellules, des tissus et d'assurer sa protection en éliminant ses propres constituants endommagés ou encore les pathogènes et substances étrangères de notre environnement. Une des caractéristiques importantes du bon fonctionnement du système immunitaire est la capacité de l'organisme à reconnaître les constituants normaux de l'organisme « le soi » et les agents pathogènes « le non-soi » ou les constituants altérés de l'organisme qui doivent être éliminés [1]. L'immunité est divisée par deux composantes qui agissent de manière coopérative et interdépendante afin d'obtenir une meilleure protection de l'hôte. La première correspond à l'immunité innée (figure 1-1) qui est caractérisée par une réponse non spécifique, mais qui de plus en plus tend à être définie comme semi-spécifique dû à sa reconnaissance des structures conservées des molécules du pathogène (PAMP: *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) par divers récepteurs membranaires ou cytoplasmiques (PRR: *Pattern Recognition Receptor*) [2]. Dans certains cas, cette réponse n'est toutefois pas suffisante pour éliminer le pathogène, c'est à ce moment qu'intervient la réponse immunitaire adaptative. L'immunité adaptative est, quant à elle, une réponse spécifique à un pathogène précis capable de produire des cellules mémoires afin de reconnaître le même pathogène qui résulte d'une seconde infection [3].

1.1.1 L'immunité innée

Évolutivement très ancien, le système immunitaire inné possède plusieurs caractéristiques semblables autant chez les plantes que les animaux. Il constitue la première ligne de défense de l'organisme contre un pathogène. L'immunité innée (figure 1-1) est caractérisée par des protections mécaniques, comme la peau, qui assure une première protection afin d'éviter que le pathogène puisse pénétrer dans l'organisme. Le mucus sécrété par les muqueuses agit également comme une barrière protectrice en empêchant aux bactéries d'adhérer aux cellules épithéliales. De plus, les particules étrangères et les pathogènes emprisonnés dans le mucus sont éliminés par le mouvement ciliaire causé par la toux et les éternuements. Les larmes et la salive contiennent des composantes bactéricides qui aident à prévenir l'intrusion de pathogènes ou de substances étrangères.

Si un pathogène parvient tout de même à contourner ces barrières physiques (peau/mucus), le mécanisme phagocytaire par les neutrophiles et les macrophages débute. Pour être en mesure de déterminer « le soi » du « non-soi », les cellules phagocytaires possèdent des PRR capables de reconnaître des PAMP [4] qui sont très conservés, c'est-à-dire, qu'ils possèdent peu de mutations. Les macrophages reconnaissent également les cellules apoptotiques afin de les éliminer et de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Les cellules apoptotiques ne sont pas signe d'une invasion par un pathogène, c'est pourquoi aucune libération de médiateurs inflammatoire n'est nécessaire. La phagocytose des pathogènes par les macrophages ou les neutrophiles à la suite d'une reconnaissance des PAMP induit la fusion du pathogène avec le phagosome qui sera soumis aux microbicides. De plus, lors de la réponse immunitaire innée, le système du complément sera également activé. Le complément qui regroupe une vingtaine de protéines plasmatiques, sera activé lorsqu'un pathogène pénètre la circulation sanguine. L'activation du complément induit l'activité des protéases libérant des peptides qui est à l'origine d'une réaction inflammatoire. Le complément permet également d'opsoniser les bactéries et de favoriser leur phagocytose par les neutrophiles et les macrophages [5, 6]. Lors d'une infection virale, le virus peut se répliquer au sein d'une cellule hôte et c'est les cellules tueuses naturelles (NK: *Natural Killer*) qui assurera le rôle de détruire les cellules infectées [4]. À la suite d'une infection ou d'une lésion tissulaire, des médiateurs d'alarme comme des cytokines proinflammatoires et antivirales sont produites par les macrophages permettant de limiter l'invasion des pathogènes.

1.1.2 L'immunité adaptative

Le pathogène peut parfois résister aux mécanismes de l'immunité innée et se multiplier dans les cellules immunitaires ou non immunitaires. Le système immunitaire adaptatif (figure 1-1) viendra compléter la réponse immunitaire innée [7]. Le système immunitaire adaptatif constitue la seconde ligne de défense contre les pathogènes. Il est beaucoup plus récent dans l'évolution puisque le mécanisme de génération de récepteurs sur les cellules immunitaires adaptatives implique un grand nombre de réarrangements génétiques qui leur permet de reconnaître spécifiquement n'importe quel pathogène, c'est donc un processus qui demande plus de temps. Cependant, lors d'une seconde infection la réponse immunitaire est plus rapide

dû à la mémoire immunologique [8]. La réponse immunitaire adaptative est caractérisée par la multiplication et la différenciation des lymphocytes B et T qui possèdent respectivement, des récepteurs *B-cell Receptor* (BCR) et *T-cell Receptor* (TCR) qui vont se lier aux Ag libres, mais le plus souvent présenté par une cellule présentatrice de l'Ag (CPA). Ce sont les lymphocytes B, lorsqu'ils se différencient en plasmocytes, qui sont responsables de la reconnaissance de l'Ag et de la production d'anticorps (Ac) afin de neutraliser le pathogène, tandis que les lymphocytes T régulent les réponses immunitaires des autres cellules ou, ils attaquent directement les cellules possédant un Ag spécifique [5]. Les Ac, également nommé immunoglobulines (Ig), sont constitués de quatre chaînes peptidiques: deux chaînes légères de 25 kDa et de deux chaînes lourdes de 50 kDa et plus. Chaque chaîne contient des régions constantes et des régions variables qui sont formées par la recombinaison des gènes V et J pour les chaînes légères et V, D et J pour les chaînes lourdes [9]. Les cellules dendritiques ont également un rôle au niveau du système immunitaire adaptatif. Constituées de plusieurs sous-groupes, les cellules dendritiques ont malgré tout une fonction commune, celle de capturer et de présenter l'antigène des pathogènes afin d'activer les lymphocytes T [10]. On peut distinguer deux sous-classes de cellules T: les lymphocytes T cytotoxiques (CTL: *Cytotoxic T Lymphocytes*) / lymphocyte T CD8⁺, qui possèdent une activité cytotoxique ayant pour rôle de trouver les anomalies comme les cellules âgées ou infectées afin de les éliminer et les lymphocytes T auxiliaires (T_H: *Helper cells*) / lymphocyte T CD4⁺. Les cellules T_H sont activées par les CPA et ils ont pour rôle d'activer les autres lymphocytes en sécrétant des cytokines [11].

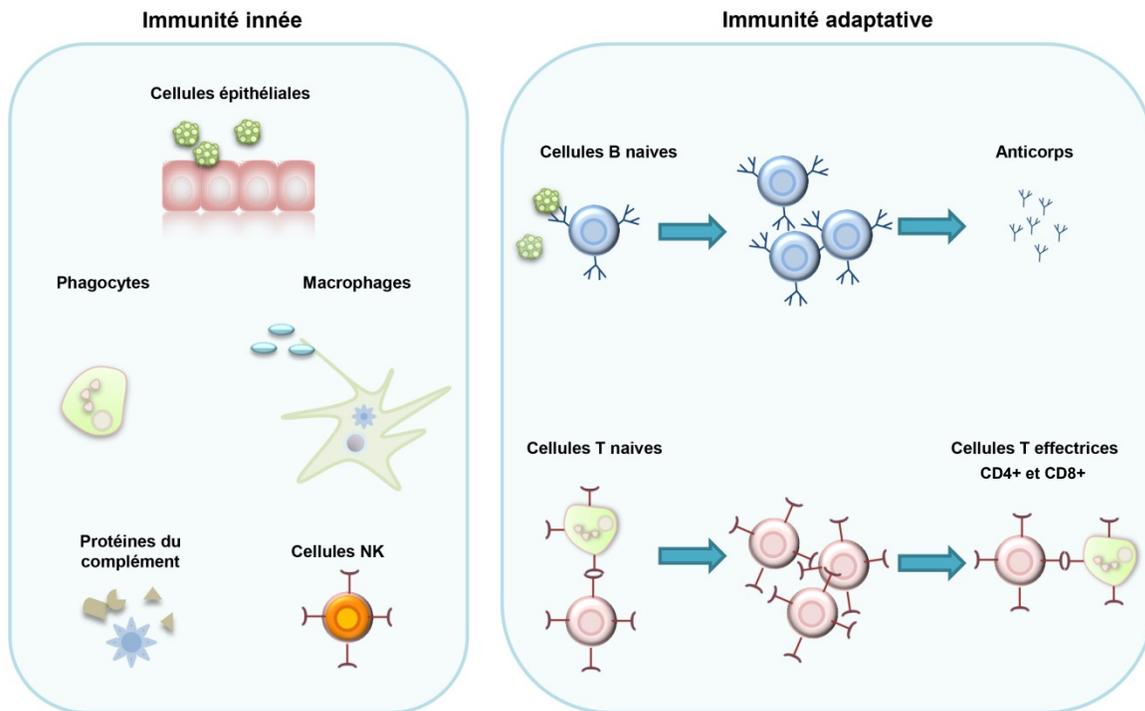


Figure 1-1: Schéma du système immunitaire inné et adaptatif.

L'immunité innée est caractérisée par les cellules épithéliales, les phagocytes, les macrophages, les protéines du complément et les cellules NK. Le système adaptatif est caractérisé par les cellules B capables de fabriquer des anticorps, de cellules T CD8⁺ et de cellules T CD4⁺.

1.1.3 La communication entre l'immunité innée et adaptative par les cytokines et chimiokines

Le système immunitaire, dans sa globalité, représente un réseau de communications très complexe qui est assuré par des médiateurs tels que les cytokines et les chimiokines (figure 1-1.3). Ce sont de petites protéines ou polypeptides solubles qui orchestrent la communication cellulaire dans un mode paracrine, endocrine, juxtacrine ou autocrine [12]. Il est essentiel, afin d'assurer une défense efficace, que les cellules du système immunitaire inné et adaptatif puissent communiquer entre elles de manière efficace. La liaison des cytokines aux récepteurs peut induire une variété de réponse selon la cytokine et la cellule cible (tableau 1). Parmi ses nombreuses fonctions, il y a le contrôle de la prolifération et la différenciation des cellules ainsi que la réponse antivirale. Les chimiokines font partie de la famille des cytokines. Elles ont la fonction de contrôler la migration des cellules du système immunitaire.

Tableau 1: Rôles et fonctions des principales cytokines impliquées dans la réponse immunitaire. [110–113].

Cytokines	Récepteur	Source	Cible	Fonctions majeures
IL-1	IL1RI et IL1R-AcP	Macrophages	Macrophages, thymocytes, système nerveux central	Favorise l'inflammation, et la sécrétion de cytokines
IL-4	IL4R α et IL2R γ ou IL4R α et IL13R	Cellules T et mastocytes	Cellules T, cellules B, macrophages, monocytes	Différentiation des cellules T, promeut la production des IgG et IgE
IL-6	IL6R α and gp130	Macrophages, cellules T, fibroblastes	Grande variété de cellules: lymphocytes B et T, thymocytes	Favorise l'inflammation et la prolifération
IL-10	IL10R1 et IL10R2	Cellules B, cellules dendritiques	Macrophages, cellules T, cellules B	Suppression immunitaire: diminue la présentation du CMH de classe II des cellules dendritiques
IL-12	IL12Rb1 et IL12Rb2	Macrophages, cellules dendritiques, cellules B et neutrophiles	Cellules T, cellules NK	Différenciation et prolifération
IL-16	Pas défini	Cellules T, éosinophiles, mastocytes	Cellules T CD4 ⁺	Recrutement des CD4 ⁺ et cellules T
IFN α/β	IFN α R1, IFN α R2	Macrophage, fibroblastes	Cellules NK, cellules T CD8 ⁺	Induit un état antiviral, augmente l'expression des CMH de classe I
IFN γ	IFN γ R1, IFN γ R2	Cellules NK, cellules T CD8 ⁺	Macrophages, cellules NK	Promeut l'activation de cellules immunitaires et augmente l'expression du CMH de classe II
TNF α	TNFR	Macrophages, monocytes, cellules T	Neutrophiles, macrophages, monocytes, cellules épithéliales	Promeut la réponse inflammatoire
CCL3	CCR3	Neutrophiles, mastocytes, macrophages, cellules endothéliales	Cellules T, cellules NK, éosinophiles	Promeut la réponse inflammatoire, recrutement des cellules NK, migration des leucocytes
CCL5	CCR5	Neutrophiles, mastocytes, macrophages	Cellules T, cellules NK, éosinophiles	Promeut la réponse inflammatoire, migration des leucocytes

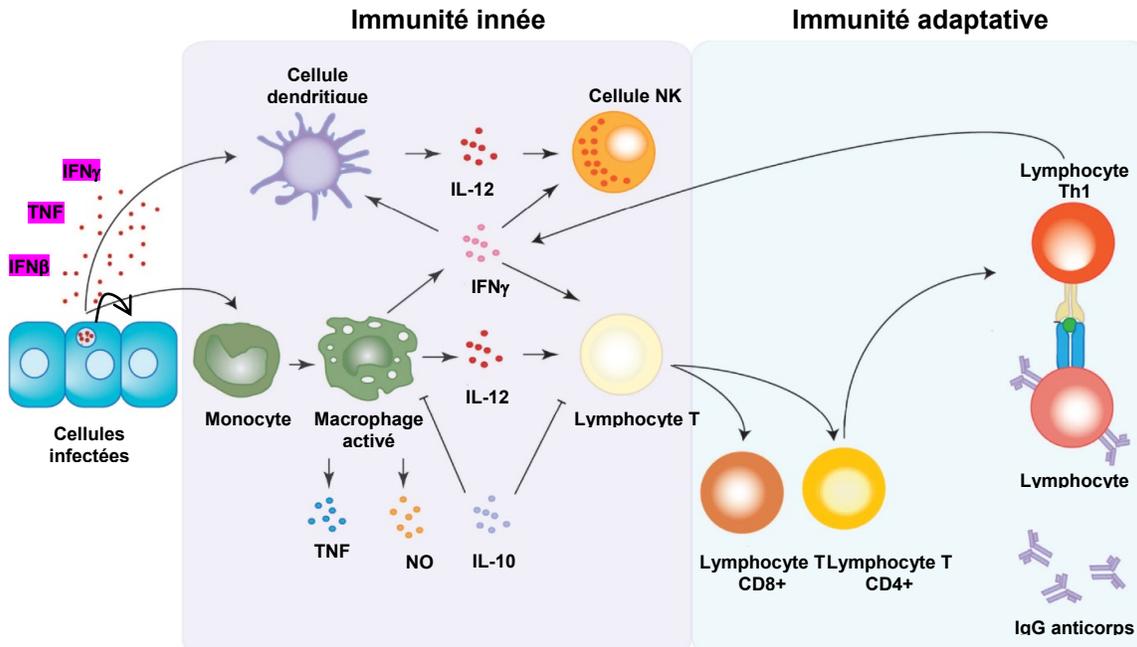


Figure 1-1.3: Communication entre le système immunitaire inné et adaptatif par les cytokines

Les cellules épithéliales sécrètent des cytokines qui vont permettre d'induire une réponse immunitaire innée et d'activer les cellules de l'immunité innée. Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques vont sécrétés des cytokines pour activer le système immunitaire adaptatif.

Schéma adapté de Eileen A. McLaughlin, *Frontiers in Immunology*, 2014 [114]
Avec la permission de *Frontiers in Immunology*

1.2.0 Les cellules épithéliales, la première barrière physique

Les cellules épithéliales des voies aériennes sont constamment exposées à de nombreux agents pathogènes qui sont inhalés (figure 1-2.0). Il est maintenant très bien défini que les cellules épithéliales aériennes sont une barrière physique par leur système de transport mucociliaire et par leurs jonctions serrées qui assurent une protection mécanique contre l'envahissement de ces pathogènes. L'épithélium pulmonaire de type mucociliaires est principalement composé de cellules ciliées, de cellules basales et d'une faible quantité de cellules caliciformes qui permettent la production de mucus, composé de mucines et de mucopolysaccharides. Un battement ciliaire permet la mobilisation du mucus qui contient les particules étrangères et des bactéries qui seront emprisonnées. À la suite d'une infection, les cellules épithéliales des voies aériennes ont la capacité de sécréter, dans la lumière des voies respiratoires, des substances antimicrobiennes comme des β -défensines et des lysozymes, qui sont produites par les cellules séreuses des glandes sous-muqueuses. L'ensemble de ces mécanismes maintient l'intégrité de l'épithélium des voies aériennes lors d'une agression par des pathogènes ou substances toxiques [13]. Par contre, il arrive que le pathogène puisse infecter les cellules épithéliales des voies aériennes. La reconnaissance des PAMP par les cellules épithéliales pulmonaires est réalisée par les PRR, il existe trois catégories de PRR: les *Toll-Like Receptors* (TLR), *Retinoic acid-Inducible Gene* (RIG)-*I-Like Receptors* (RLR) et les *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD)-*Like Receptors* (NLR) [14]. Cette reconnaissance permet d'induire trois voies de signalisation principales: la voie NF κ B, la voie *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) et la voie *Interferon Regulatory Factors* (IRF). Les voies NF κ B et MAPK sont surtout impliquées dans l'induction de la réponse pro-inflammatoire, tandis que la voie de signalisation par les IRF est essentielle pour la production des *Interferons* (IFN) qui permet d'activer rapidement une réponse antivirale [15]. L'expression de ces médiateurs, tels que NF κ B, les MAPKs et IRF, permet l'induction d'un large éventail de gènes antiviraux et pro-inflammatoires en plus d'indiquer aux cellules voisines la présence d'un pathogène. De plus, la sécrétion de cytokines et de chimiokines produites par les cellules épithéliales pulmonaires permettra le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire inné et du système immunitaire adaptatif [16, 17].

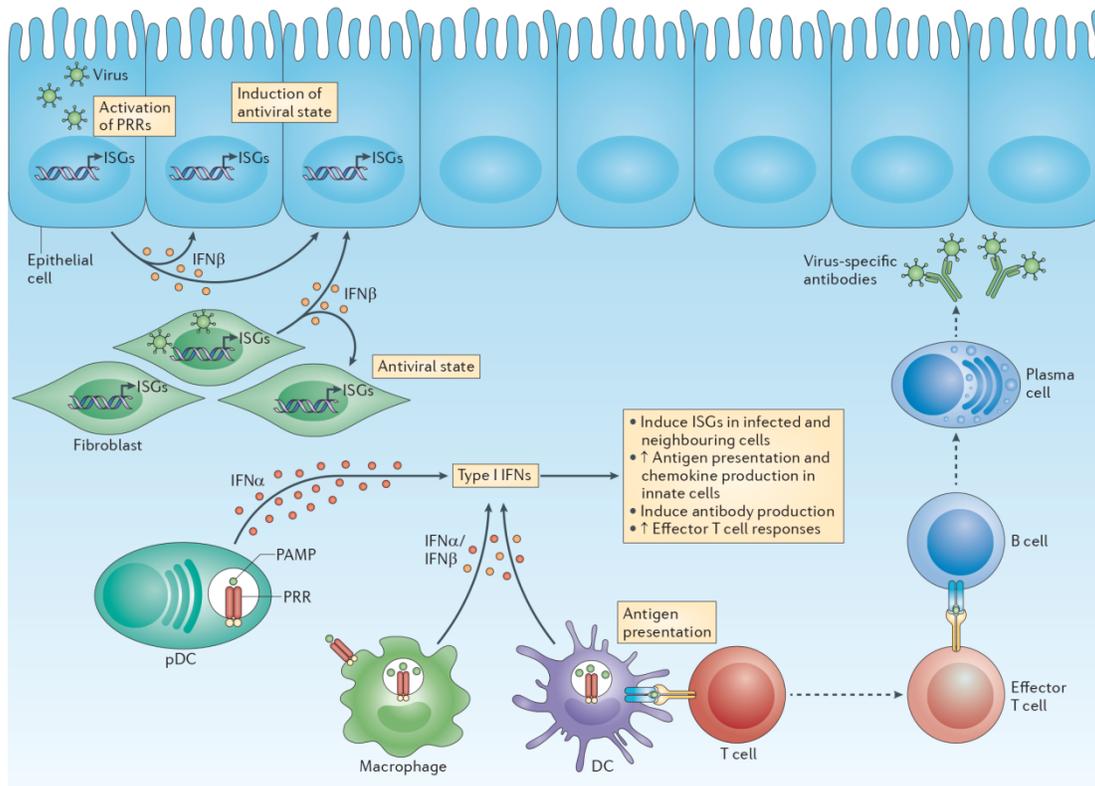


Figure 1-2.0: La sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales pulmonaires, une première barrière physique.

Les cellules épithéliales pulmonaires permettent d'induire une première vague de cytokines en réponse à un virus. Ces cytokines permettent d'activer le système immunitaire inné par les cytokines, ce qui induira le système immunitaire adaptatif.

Schéma provenant de Laura T. Donlin, *Nature reviews. Immunology*, 2014 [85].

Avec la permission de Nature Publishing Group.

1.2.1 En réponse à une infection virale, les cellules épithéliales des voies aériennes induisent un état antiviral par l'expression de cytokines

Tel que discuté précédemment, l'épithélium des voies respiratoire induit la transcription de plusieurs cytokines lors d'une infection virale, qui est essentiel pour induire un état antiviral et pro-inflammatoire [14]. Le tableau 2 présente une liste des principales cytokines sécrétées en réponse à une infection respiratoire. Dans le contexte de notre projet, nous nous intéressons particulièrement au *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF α) et à l'IFN β , deux cytokines produites lors d'une infection virale.

Lors d'une infection virale, l'IFN β est rapidement induit afin d'inhiber précocement la réplication du virus. L'expression de l'IFN β est régulée au niveau transcriptionnel par les IRF, AP-1 et NF κ B, qui vont se lier aux domaines PRDI-IV du promoteur [18, 19]. L'IFN β sécrété par les cellules infectées va se lier à son récepteur IFNAR et permettre l'activation de plusieurs voies de signalisation telle que la voie JAK/STAT qui permet l'expression des *Interferon Stimulated Genes* (ISG) afin d'induire une réponse antivirale [20, 21].

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire qui permet l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans le développement d'une réponse immunitaire par différents mécanismes tels que la différenciation des lymphocytes et la formation des tissus lymphoïdes secondaires et tertiaires [22]. Le TNF α a également un rôle prédominant dans trois processus, soit l'induction de l'apoptose cellulaire, la nécrose programmée et l'activation de NF κ B [23]. Il est régulé par deux mécanismes, le premier se fait de manière transcriptionnelle au niveau du promoteur qui contient des motifs similaires au site de liaison de NF κ B et AP-1 et le deuxième se fait de façon post-traductionnelle, c'est-à-dire par le clivage protéolytique [24, 25]. La liaison du TNF α avec son récepteur *Tumor Necrosis Factor Receptor* (TNFR) permet l'activation des voies de signalisation de NF κ B et de *Jun N-terminal Kinases* (JNK) [26] qui régulent la synthèse de nombreux gènes proinflammatoires et anti-apoptotiques [27].

Tableau 2: Rôles et voies de signalisation des cytokines produites lors de la réponse immunitaire des cellules épithéliales des voies aériennes [115–120].

Cytokines	Récepteurs	Kinases impliquées	Facteur de transcription	Fonctions majeures
TNF α	TNFR	-	NF κ B, AP-1	Induit une réponse pro-inflammatoire
IFN γ	IFN γ R1	JAK1+JAK2	STAT 1, 2, 3, 5	Inhibe la réplication virale et induit une réponse pro-inflammatoire
IFN λ	IFN- λ R1 IL-10R2	JAK1+TYK2	STAT1, 2, 3, 5	Inhibe la réplication virale
IL-1	IL1R	IRAK1	NF κ B	Induit une réponse pro-inflammatoire, recrute les macrophages et les cellules NK au site d'infection
IL-4	IL4R α	JAK1+JAK3	STAT6	Inhibe la réplication virale
IL-6	IL6R α	JAK1	STAT 1, 3, 5	Induit une réponse pro-inflammatoire
CXCL8	CXCR3	-	AP-1, NF κ B, ERK	Active de la réponse immunitaire
IL-10	ILR α	JAK1+TYK2	STAT 1, 3, 5	Réprime de la réponse proinflammatoire
IL-18	IL18R	-	NF κ B	Permet l'induction de l'immunité à médiation cellulaire
IL-27	IL27R α/β	JAK1	STAT 1, 3, 5	Induit une réponse proinflammatoire
CXCL10	CXCR3	-	ERK, AP-1	Permet l'activation de cellules T
IFN α/β	IFNAR	JAK1+TYK2	STAT1, 2, 3, 5	Inhibe la réplication virale
CCL5	CCR5	-	NF κ B, AP-1, ERK	Recrute les cellules immunitaires aux sites d'infection

1.3.0 L'induction de la voie JAK/STAT par les IFN

La voie de signalisation *Janus Kinase (JAK)/ Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)* est une voie pléiotropique permettant l'activation d'une multitude de signaux. Elle est reconnue pour être activée par toute une gamme de cytokines et de facteurs de croissance, mais elle a initialement été découverte au cours des études sur l'effet des IFN impliqués dans la migration cellulaire, la prolifération, la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose [28, 29]. La liaison des IFN aux récepteurs IFNAR induit une multimérisation permettant l'activation de signaux intracellulaires [29]. Plus précisément, les domaines cytoplasmiques des récepteurs s'associent à des tyrosines kinase, que l'on nomme JAK qui s'autophosphorylent et phosphoryleront également les tyrosines des récepteurs des cytokines. Ces phosphotyrosines constituent des sites d'arrimage pour les STATs ainsi que d'autres protéines de signalisation. Chez les mammifères, il existe quatre protéines de la famille des JAK: JAK1, JAK2, JAK3 et *Tyrosine Kinase 2 (Tyk2)*, chacune associée à des récepteurs des cytokines spécifiques.

Les STAT sont des facteurs de transcription latents possédant une tyrosine à l'extrémité C-terminale qui sera phosphorylée par les JAK [29]. De nos jours, sept STAT sont connus (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) et possèdent tous un domaine SH2 qui est caractérisé par deux fonctions [30]. La première fonction est leur capacité à se lier aux phosphotyrosines du récepteur des cytokines activé. C'est une fois liées à leurs récepteurs que les JAK phosphorylent le STAT sur les tyrosines ce qui provoque leur dissociation du récepteur [29]. La seconde fonction du domaine SH2 des STAT libres dans le cytosol sert de site de fixation sur une tyrosine phosphorylée d'une autre molécule STAT pour former un homodimère ou un hétérodimère. Ce dimère, qui est transloqué au noyau, s'associera avec d'autres protéines régulatrices de gènes, ce qui permettra l'expression de gènes spécifiques [31, 32]. STAT1 est un régulateur important impliqué dans l'activité antivirale, il est connu pour être activé par les IFN, mais également par le $TNF\alpha$ ce qui permet d'induire une réponse antivirale beaucoup plus efficace par l'expression de gènes antiviraux [33].

La voie de signalisation induite par l'IFN β a très bien été caractérisée à ce jour (figure 1-3.0). Deux membres de la famille Janus des tyrosines kinases sont impliqués dont JAK1 et *non-receptor tyrosine-protein kinase 2* (Tyk2), qui sont constitutivement associés à IFNAR1 et IFNAR2 respectivement. L'activation des JAK par la phosphorylation des tyrosines permet la phosphorylation de STAT1 et STAT2 qui se dimérisent, puis s'associent à IRF9 pour former le complexe ISGF3. Par la suite, ISGF3 transloque au noyau pour réguler la transcription de gènes par sa liaison à l'ADN au site *interferon stimulated response element* (ISRE), qui permet l'expression d'ISG [21, 34]. Plusieurs de ces ISG ont des effets antiviraux et plusieurs d'entre eux possèdent la même fonction antivirale. Cette redondance reflèterait probablement l'importance de l'expression des ISG dans la défense virale [35, 36]. Il est à noter que la liaison de l'IFN λ à son récepteur permet d'activer la même voie de signalisation que celle induite par l'IFN β . Le tableau 3 décrit quelques exemples d'ISG et leurs fonctions.

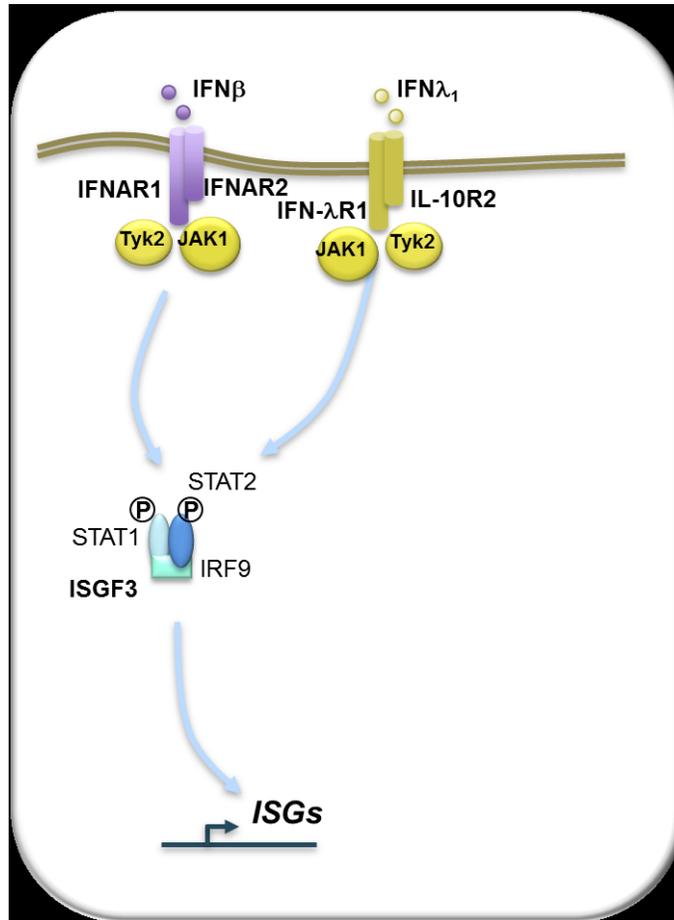


Figure 1-3.0: Voie de signalisation induite par l'IFNβ/λ

La liaison de l'IFNβ et de l'IFNλ à leur récepteur induit la phosphorylation de STAT1 et STAT2 par Tyk2 et JAK1. STAT1 et STAT2 vont dimériser et se lier à IRF9 pour former le complexe ISGF3. Ce complexe transloque au noyau pour permettre l'expression des ISG.

Tableau 3: Exemples d'ISG produits lors de la réponse immunitaire des cellules épithéliales des voies aériennes [35].

ISG	Fonctions
PKR	Inhibe la traduction des protéines virales
Mx1	Inhibe la transcription virale
APOBEC3G	Inhibe la réplication virale
TRIM5	Inhibe la réplication virale
ISG15	Fonction antivirale variée
IRF9	Inhibe la réplication virale
IFIT1/2/3	Inhibe la traduction des protéines virales et la réplication virale
ISG20	Inhibe la synthèse de l'ARN viral
OAS1/2/3	Inhibe la réplication virale

1.3.1 Voies de signalisations indépendantes de STAT1

Depuis longtemps, l'implication de STAT1 a toujours été associée aux voies induites par les IFN. Ce n'est que tout récemment qu'on observe que ces voies de signalisation peuvent être aussi indépendantes de STAT1. Une étude soutient que la voie dépendante de STAT1 est essentielle pour initier la clairance du virus Dengue (DEN) chez la souris, tandis que la voie de signalisation qui est indépendante de STAT1 intervient plus tard dans le contrôle du virus [37]. L'équipe du Dr. Robert Schreiber a démontré que les IFN peuvent réguler les mécanismes de prolifération indépendamment de STAT1 dans la lignée des phagocytes mononucléaires de souris déficientes en STAT1 [38]. Ils ont stimulé des macrophages déficients en STAT1 avec de l'IFN γ et ont comparé l'expression des gènes avec les macrophages STAT1^{+/+} qui ont été stimulés par l'IFN γ . Étonnamment, ils ont observé que les gènes exprimés étaient similaires dans les macrophages déficients en STAT1 que dans les macrophages ayant STAT1. Les récepteurs de l'IFN γ activent des voies de signalisation supplémentaires qui permet la régulation de gènes indépendamment de STAT1. La diversité des gènes exprimés par les mécanismes dépendants et indépendants de STAT1 permet une complémentation. L'équilibre de ces deux voies joue donc un rôle important dans la réponse biologique de l'IFN γ [39].

1.4.0 Actions synergiques entre cytokines

Beaucoup d'études ont été réalisées afin de caractériser les voies de signalisation induites par les cytokines. Cependant, la plupart de ces études ont été faite à la suite de stimulations uniques des cytokines. Or, dans des conditions physiologiques, une cellule est surtout soumise à plusieurs cytokines simultanément. Par contre, au cours de ces dernières années, plusieurs recherches ont permis d'élucider les événements moléculaires induit par l'action synergique des cytokines avec leurs récepteurs. C'est tout récemment, plus précisément en 2009, que les premières études spécifiques à l'action synergique entre IFN β +TNF ont été réalisées sur des fibroblastes primaires humains. Cette costimulation induit de manière tardive l'expression d'un panel de gènes antiviraux distinct qui n'était pas sensible à l'IFN β ou au TNF [40]. Par définition, la synergie signifie que les effets combinés sont

supérieurs à la somme des effets individuels, comparativement à un effet additif où l'effet combiné est égal à la somme des effets de chaque produit individuel [41, 42]. À ce jour, les mécanismes moléculaires à la base de la synergie, sont peu caractérisés. Par contre, des modèles de synergie ont été proposés [42].

Dans la littérature, trois modèles de synergie ont été suggérés (figure 1-4.0). Le premier mécanisme est caractérisé par une « action indépendante », c'est-à-dire, que deux voies de signalisations distinctes permettent l'expression de gènes dont les activités agissent de façon synergique. Le second mécanisme, dénommé « action coopérative » suggère que l'expression d'un gène est augmentée lors d'une costimulation par rapport à son induction par chacune des cytokines. Cette augmentation serait possible grâce à l'action de différents facteurs de transcription activés indépendamment par chacune des cytokines [43]. Le troisième mécanisme nommé « induction coopérative » caractérisé par une situation où les deux cytokines déclenchent la transcription de gènes spécifiques [40] suggérant qu'il y a une nouvelle voie de signalisation qui est induite par l'action synergique entre ces deux cytokines. Une récente étude faite dans notre laboratoire a démontré que l'action synergique entre $TNF\alpha+IFN\beta$ permet tardivement l'expression de *DUOX2*, une *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen* (NADPH) oxydase qui permet la production de peroxyde d'hydrogène, par une voie de signalisation impliquant STAT2 et IRF9 mais, indépendamment de STAT1.

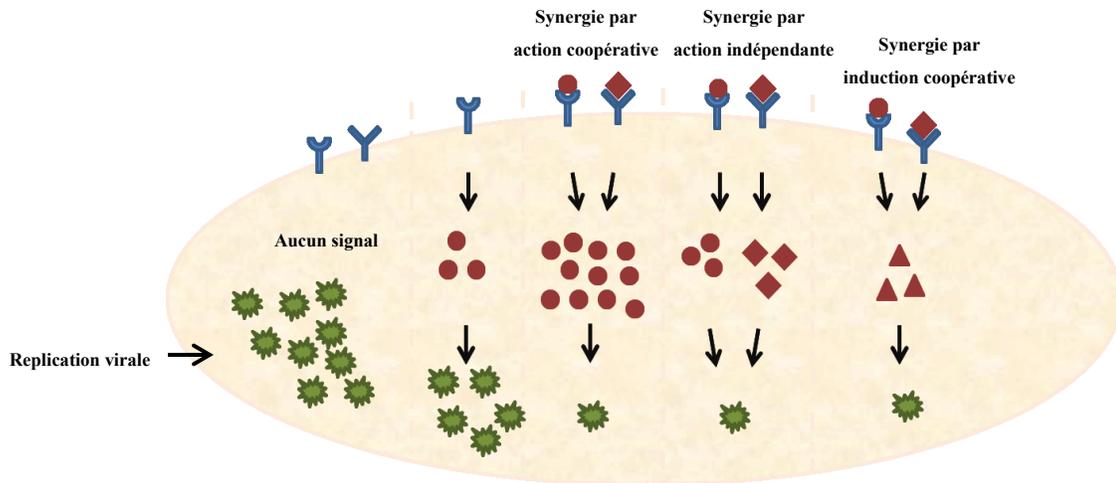


Figure 1-4.0 : Mécanisme de la synergie des cytokines antivirales

Trois mécanismes proposés : Synergie par action coopérative où chacune des cytokines augmentent le niveau d'expression d'une même protéine antivirale ; Synergie par action indépendante où plusieurs catégories de protéines antivirales induites par chacune des cytokines individuellement augmentent la réponse antivirale ; Synergie par induction coopérative où l'action des cytokines induits l'expression de protéines antivirales qui ne sont pas induites par l'une ou l'autre des cytokines.

Hypothèse et objectifs de travail

Les voies respiratoires sont constamment exposées à un éventail d'agents pathogènes, y compris les virus respiratoires. Les cellules épithéliales des voies aériennes sont les premières cibles au site d'infection qui induisent une première réponse antivirale par la sécrétion de cytokines [44]. Cette première vague de cytokines contient, entre autres, les IFN de type I (α/β) et le $\text{TNF}\alpha$, connus de façon indépendante pour inhiber la réplication virale par l'activation de voies de signalisation distinctes qui permettent la transcription de gènes antiviraux et immunorégulateurs [45]. Déjà bien documenté, les IFN de type I médient majoritairement la réponse antivirale en induisant la phosphorylation de STAT1 et STAT2 qui se complexent avec IRF9 pour former le complexe de transcription ISGF3 afin d'induire de manière précoce l'expression de centaines de gènes ISG codant pour des protéines virales [46]. Le $\text{TNF}\alpha$ joue un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire en plus d'activer les facteurs de transcription $\text{NF}\kappa\text{B}$ et AP-1 qui permettent l'expression de gènes antiviraux [22, 47].

Plusieurs études ont démontré que la stimulation avec plusieurs combinaisons de cytokines antivirales agissent en synergie pour produire une réponse antivirale beaucoup plus puissante que lors d'une stimulation unique de ces cytokines [42]. De plus, il a été découvert récemment, avec la technique des puces à ADN, que le $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IFN}\beta$ agissent de manière synergique pour exprimer de façon tardive un panel de gènes qui sont peu ou pas induit par l'une ou l'autre de ces cytokines lorsqu'elles sont utilisées séparément [45]. Des données antérieures de notre laboratoire ont démontré que la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ permet l'expression de *DUOX2* une NADPH oxydase qui produit du H_2O_2 et contribue au développement d'état antiviral alternatif tardif [44]. L'étude de l'expression de *DUOX2* a permis de démontrer l'implication d'une voie de signalisation impliquant IRF9 ainsi que la phosphorylation de STAT2, mais qui est indépendante de STAT1 contrairement à la voie classique induite par l' $\text{IFN}\beta$ seul [44].

À la lueur de ces informations, notre but est de déterminer l'importance de cette nouvelle voie de signalisation induite par la costimulation du $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$, impliquant STAT2 et IRF9, indépendamment de STAT1 dans la régulation d'un programme transcriptionnel antiviral et immunorégulateur tardif. Nous nous sommes donc posé les deux questions suivantes:

- 1- Quels sont les gènes antiviraux et immunorégulateurs qui sont induits par la costimulation avec l' $\text{IFN}\beta$ et le $\text{TNF}\alpha$ et qui sont dépendants de la voie STAT2/IRF9, indépendamment de STAT1 ?
- 2- Est-ce que STAT6, qui est un régulateur connu de *DUOX2* en réponse à IL4+IL13, est impliqué dans l'induction de *DUOX2* en réponse à la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$?

Chapitre 2: Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Tous les milieux et les suppléments ont été achetés chez Gibco (Thermo Fisher, États-Unis). Des cellules A549 (*American Type Culture Collection ATCC*) ont été cultivées dans un milieu Ham/F12K complété avec 10% de sérum de bovin fœtal (FBS), inactivé à la chaleur (HI-FBS), 1% de L-glutamine, 1% de pyruvate de sodium et 1% d'acides aminés non essentiels. Les cellules U3A sont STAT1-négatives et les U3AR sont STAT1-positives, provenant d'une lignée cellulaire du sarcome humain (HT 1080) qui ont été transfectées avec un vecteur codant pour un marqueur sélectionnable (guanine phosphoribosyltransférase) régulé par l'interféron alpha (IFN α) pour créer la lignée cellulaire 2FTGH. La mutagenèse chimique des 2FTGH a permis la sélection d'un certain nombre de mutations de la voie de signalisation induite par l'IFN. Les cellules U3A et U3AR ont été cultivées dans un milieu DMEM complété avec 10% FBS, 1% de L-glutamine, 1% de pyruvate de sodium et 1% d'acides aminés non essentiels. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans un incubateur à 37 °C et à 5% de CO₂.

Infection virale

La souche Sendai (SeV) Cantell a été obtenue auprès du laboratoire de Charles River. L'infection SeV a été réalisée à 40 unités d'hémagglutinine (HAU) par 10⁶ cellules dans un milieu sans sérum (SFM) pendant 2 heures, après quoi le milieu a été complété avec 10% HI-FBS. Les cultures cellulaires ont été infectées à une confluence de 90%. Les cultures cellulaires ont été préalablement rincées avec un milieu de culture F12K pour les A549 et DMEM pour les U3A/U3AR, dans un milieu SFM. L'infection SeV a été réalisée à 40 unités d'hémagglutinine (HAU) par 10⁶ cellules dans un milieu SFM pendant 2 heures, après quoi le milieu a été complété avec 10% HI-FBS et l'infection a été poursuivie jusqu'à la récolte au temps indiqué dans la section résultats.

Stimulation par les cytokines

Les cellules ont été stimulées à une confluence de 90%. Les cultures cellulaires ont été préalablement rincées avec un milieu de culture F12K pour les A549 et DMEM pour les U3A/U3AR, sans sérum et 1% de glutamine. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu

F12K (A549) ou DMEM (U3A/U3AR) contenant 2% FBS et 1% de glutamine additionné de TNF α (10ng/mL) et/ou IFN β (1000U/mL) ou IL4 (50ng/mL) et IL13 (12ng/mL). La stimulation a été poursuivie pendant différents temps indiqués dans la section résultats.

Transfection d'ARN interférants (ARNi)

Les cultures de U3A et de A549 ont été transfectées à une confluence entre 30-40%, par des ARNi ciblant des séquences spécifiques complémentaires afin de bloquer l'expression de protéines d'intérêts. Les séquences des ARNi (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, États-Unis) utilisées sont décrites dans le tableau 4. Tout d'abord, les cellules ont été lavées avec de l'OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, États-Unis). Ensuite, le mélange contenant le réactif de transfection oligofectamine (Thermo Fisher Scientific, États-Unis) avec l'optiMEM, fait selon le protocole de la compagnie, ainsi qu'un second mélange contenant les oligos ARNi (concentration finale de 100pmol pour une plaque de 24 puits complété avec 37.5 μ L d'OptiMEM) ont été mis en contact. Une fois mélangé, ils ont été incubés pendant 20 minutes à température ambiante puis ajoutés goutte par goutte dans les plaques de culture de cellules. Après 4 à 6 heures suivant la transfection, 250 μ L de milieu de culture F12K contenant 30% de FBS a été ajouté de manière à recouvrir les cellules puis, les plaques ont été agitées. Après 48 heures de transfection, les cellules ont été stimulées/infectées ou non selon les conditions décrites dans la section résultats.

Tableau 4: Séquences d'ARNi utilisés dans notre étude

Nom des ARNi	Cible	Séquence sens
siCTRL	Pas de cible	5'-CAU AGC GUC CUU GAU CAC AUU-3'
siSTAT2	STAT2	5'-GGA CUG AGU UGC CUG GUU AUU -3'
siIRF9	IRF9	5'-GCA GAG ACU UGG UCA GGU AUU-3'
siSTAT6(1)	STAT6	5'-GGA UGG CUC UCC ACA GUA AUU-3'
siSTAT6(2)	STAT6	5'-GGA AUG GCG CAC CGU UUG AUU-3'

Extraction protéiques totales

Après le temps approprié de stimulation, le milieu a été aspiré et les cellules ont été grattées dans du ddPBS (Phosphate Buffered Saline) 1X froid (4°C). Un second volume de ddPBS a été ajouté aux plaques pour les rincer et récupérer les cellules restantes. Les cellules ont été centrifugées pendant 30 secondes à 13000 rpm. Le surnageant a été aspiré et le culot a été suspendu dans le tampon de lyse NP-40 (50mM Hepes pH7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 10%(p/v) Glycérol, 1%; Nonidet P-40) complété par des inhibiteurs de protéase ; leupeptine: 1µg/ml et aprotinine: 2µg/ml ainsi que des inhibiteurs de phosphatase ; NaF: 30mM, Na₃VO₄: 1mM, PNPP: 10mM et β-glycérophosphate pH 7,5: 25mM). Les échantillons ont été incubés sur glace pendant 20 minutes durant lesquelles ils ont été vortexés 2 à 3 fois. Ils ont ensuite été congelés et décongelés 3 fois dans de l'azote liquide pour lyser les noyaux. Pour extraire STAT6, les cellules ont également été lysées avec du tampon de lyse NP-40 puis vortexées 3 fois pendant 5 minutes avant de soniquer sur glace 2 fois pendant 20 secondes. Ensuite, les échantillons ont été incubés sur glace pendant 10 minutes. Les extraits ont été centrifugés à 13000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant correspond à l'extrait protéique cellulaire total (WCE). Les échantillons ont ensuite été quantifiés par la méthode de Bradford (Biorad, Mississauga, Ontario, Canada) [48].

Quantification des protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode est basée sur le principe de colorimétrie, basé sur le changement d'absorbance. La couleur du bleu de Coomassie suite à la liaison avec les acides aminés des protéines permet le changement de couleur. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié aux protéines ceci indique ainsi la concentration en protéine dans l'échantillon. Cette quantité sera proportionnelle à la concentration de l'échantillon en protéines [49]. Le réactif de Bradford (Biorad, Mississauga, Ontario, Canada) a d'abord été dilué, 1 dans 5, dans du ddH₂O. Ensuite, 1mL de réactif dilué a été ajouté à chaque tube. Une courbe standard a été préparée avec de la BSA (2mg/ml). Cinq échantillons de la gamme ont été préparés: un blanc dans lequel il n'y a pas de BSA, et quatre étalons contenant respectivement des concentrations de BSA de 4µg/ml, 8µg/ml, 12µg/ml et 16µg/ml. Une quantité identique (3-4µl) de chaque WCE a été utilisée pour la quantification. Les échantillons et les étalons ont été vortexés immédiatement. Les échantillons ont été incubés 5 minutes à température ambiante puis la densité optique a été mesurée dans une plaque de 96 puits (200µl d'étalon ou d'échantillon par puits) à une longueur d'onde de 595nm.

Electrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage.

15µg de WCE et 30µg de WCE pour la visualisation de la protéine STAT6 furent soumis à une électrophorèse SDS-PAGE sur un gel de 7,5% d'acrylamide dans le tampon de migration (Tris: 25mM, SDS: 0,1% (p/v) et glycine: 190mM dans de l'eau double distillée) et pour la visualisation de SeV, sur un gel de 12% d'acrylamide dans le tampon de migration. Le gel SDS-PAGE est composé d'acrylamide (acrylamide-bis-acrylamide)/40% solution (bioshop). Le tampon de migration est constitué de Tris 1.5M, SDS 0.4%, ddH₂O et le pH est ajusté à 8.8. Le tampon de concentration (stacking) est constitué de Tris 0.5M, SDS 0.2%, ddH₂O et le pH est ajusté à 6.8. L'utilisation d'un gel à 7.5% d'acrylamide a été préparée. Du tampon de chargement 5X (200mM Tris-HCl 0,5M pH 6.8, SDS 15%, Glycérol 30%, Beta-mercaptoéthanol 5%, bromophénol bleu 0,25%, ddH₂O) a été ajouté aux échantillons dosés pour un ratio 4:1 (échantillon: Tampon). Les échantillons ont été chauffés pendant 10 minutes à 100°C et ont été chargés sur le gel SDS-PAGE. La migration a été effectuée, en ampères constants, à 30mA par gel, jusqu'à ce que le front de migration ait été sorti du gel. Une fois la

migration terminée, les protéines furent ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Biorad, Mississauga, Ontario, Canada) dans le tampon de transfert (glycine: 190mM et tris: 25mM) pendant environ 1h30 à 200mA. Les protéines furent ensuite fixées (acide acétique: 7%, éthanol: 40%, glycérol: 3% dans de l'eau double distillée). Les membranes furent par la suite bloquées dans du PBS contenant 5% de lait écrémé ainsi que 0,05% de Tween 20 (solution de blocage) pour 1 heure à température pièce. Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS/0,05% Tween, les membranes ont été incubées pendant une minute dans une solution de rouge ponceau. Les protéines ont été alors visibles et les puits ont pu être annotés et le marqueur de poids moléculaire a été identifié. La membrane a été lavée au PBS pendant 5 minutes et les protéines ont été fixées. La membrane a été ensuite bloquée dans du lait PBS-Tween 5% pendant 1 heure. Les protéines ont été détectées avec des anticorps spécifiques (tableau 5). La membrane a été lavée 5 fois pendant 5 minutes avec du PBS-Tween, incubée 1 heure avec de l'anti-lapin couplé à la peroxydase (Jackson Laboratories, Farmington, États-Unis, 1/10000) ou avec l'anti-mouse couplé à la peroxydase (KPL, 1/10000) tel qu'indiqué dans le tableau 5. Après incubation, la membrane a subi 5 lavages de 5 minutes avec du PBS/0,05% Tween et un dernier lavage de 5 minutes avec du PBS. Les protéines furent visualisées par addition d'ECL (supersignal picowest; Thermo Fisher, États-Unis) et visualisées par ImageQuant (LAS 4000 mini).

Tableau 5: Anticorps utilisés dans notre étude

Anticorps	Concentrations /dilutions	Temps d'incubation	Anticorps secondaire	Source commerciale	Numéro de catalogue
STAT1-phosphospécifique-Tyr701 (Monoclonale)	1/1000	O/N	Lapin	Cell Signaling	9171
STAT1 (Polyclonale)	1/2000	3hrs	Lapin	Cell Signaling	9172
STAT2-phosphospécifique-Tyr690 (Polyclonale)	1/2000	O/N	Lapin	Cell Signaling	4441
STAT2 (Polyclonale)	1/2000	3hrs	Lapin	Cell Signaling	4594
STAT6-phosphospécifique-Tyr641 (Monoclonale)	1/1000	O/N	Lapin	Cell Signaling	7649P
STAT6 (Monoclonale)	1/1500	O/N	Lapin	Cell Signaling	5397
IRF9 (Monoclonale)	0.125µg/mL	O/N	Souris	BD bioscience	610285
SeV	1/7000	3hrs	Lapin	Dr John Hiscott	-
Actine	1/10000	15 minutes	Souris	Chemicon	MAB1501

Extraction d'ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du Kit « RNAqueous-96PCR kit » (Ambion, Thermo Fisher Scientific, États-Unis). Brièvement, le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été lavées avec du milieu de culture sans sérum chaud. Les plaques ont été mises sur glace et les cellules ont été grattées avec la solution « Lysis/Binding ». De l'éthanol a été ajouté aux échantillons afin de faire précipiter l'ADN, puis finalement 150µl d'échantillon ont été ajoutés à la plaque filtre fournie avec le kit qui permet de retenir les ARN contenus dans les échantillons. La plaque filtre a été soumise à une centrifugation à 1000 x g pendant 3 minutes. Cette étape a été répétée jusqu'à ce qu'il ne reste plus d'échantillon. Ensuite les puits de la plaque filtre ont été lavés avec de la solution « Wash Solution » et la plaque a été centrifugée à 1000 x g pendant 3 minutes et un autre 2 minutes afin d'enlever tout résidu de « Wash Solution » qui pourrait être dans la plaque à filtre. Un traitement à la DNase a été réalisé, en ajoutant de la DNase I avec le buffer DNase I à chacun des puits. L'incubation a été réalisée pendant 30 minutes à 37°C. Ensuite, la « solution de Rebinding » a été ajoutée suivi d'une centrifugation à 1000 x g pendant 3 minutes et d'une seconde pendant 2 minutes. Deux lavages ont été faits avec de la solution « Wash Solution », suivis d'une centrifugation afin d'enlever la solution de lavage. Pour terminer, la solution d'élution préchauffée a été ajoutée au centre de chaque puits. La plaque a été centrifugée à 1500g pendant 2 minutes et le volume élué qui contient les ARN totaux a été transféré dans un tube neuf. Pour précipiter l'ARN, 0.1 volume d'acétate d'ammonium 5M avec 0.02 volume d'acrylamide linéaire 5mg/mL ont été ajoutés aux échantillons. De l'éthanol 100% a aussi été ajouté et les échantillons ont été mélangés par inversion. Ensuite, ils ont été incubés à -20°C pendant 20 minutes. Le surnageant a été enlevé, puis le culot a été séché à température ambiante pendant dix minutes. Les ARN ont été resuspendus dans 15µl de solution d'élution préchauffée à 50°C. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante suivi de 20 minutes sur glace, la quantification des ARN a été réalisée.

Quantification des ARN

Les ARN totaux ont été quantifiées dans du Tris-HCl 1M pH 8. 2µl d'ARN de chaque échantillon a été ajouté à 38µl de Tris-HCl pH 8. Pour le blanc, 40µl de Tris-HCl 1M pH 8 a été utilisé. La mesure de la densité optique à 260 nm, correspondant à l'ARN et à 280 nm, correspondant à l'ADN. Le ratio entre DO_{260}/DO_{280} ne devrait pas être plus grand que 1.9 pour une pureté d'ARNm convenable de nos échantillons.

Reverse Transcriptase et PCR quantitative

La méthode de PCR en temps réel avec le SYBR Green repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent produit lors de l'amplification, qui génère une augmentation de la fluorescence qui est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Durant la phase de la dénaturation, le SYBR Green libre se fixe aux sillons mineurs de l'ADN permettant l'absorption de la lumière bleue et l'émission d'une lumière verte. Les ARNm ont été inversement transcrits avec le kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen) [50]. L'ADNc de Mx1, IDO, APOBEC3G, CXCL10, NOD2, IRF1, DUOX2, PKR furent utilisés dans une réaction de PCR en utilisant le kit QuantiTect SYBR green (Qiagen) avec les amorces décrites dans le tableau 6 et le programme recommandé par le manufacturier. L'ADNc de DUOX2 fut utilisés dans une réaction de PCR avec la technique TaqMan en utilisant le kit TaqMan (Gene Expression Assays de Life Technologies, Thermo Fisher, États-Unis (sonde: Hs00204187_m1)) [51]. La technologie TaqMan repose sur l'activité d'une exonucléase de la Taq polymérase, qui hydrolyse une sonde spécifique hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant la phase de l'extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur est alors fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation. La Taq polymérase hydrolyse la sonde seulement lorsque celle-ci est hybridée à sa séquence complémentaire. La normalisation des données a été faite à partir de l'ARNm S9, un gène codant une protéine ribosomale de la sous-unité 40S [52]. Les réactions de PCR ont été réalisées par Rotor-Gene (Corbett Research Rotor-Gene 3000). Pour la quantification des gènes, deux méthodes d'analyse ont été réalisées, soit en expression relative de chacun des gènes cibles qui ont été comparés au témoin (S9). Ainsi, nous avons effectué la différence entre le nombre de cycle moyens obtenus

pour le gène cible et le témoin selon la formule suivante : $\Delta CT = CT(\text{cible}) - CT(\text{témoin})$. Ensuite, nous avons calculé le $\Delta\Delta CT$ qui représente la différence entre le ΔCT du gène cible et la moyenne des ΔCT du témoin positif pour le même gène : $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{échantillon}) - \Delta CT(\text{témoin positif})$. Les résultats obtenus ont été transformés en puissance selon la formule: $2^{-CT\Delta\Delta CT}$. La deuxième méthode de quantification a été réalisée en valeurs absolues en s'appuyant sur des dilutions standards de plasmide de concentration connue.

Tableau 6: Conditions d'utilisation des différentes amorces dans la réaction de PCR quantitative de type SYBR Green

Amorces spécifiques		Séquence	Tm	Provenance
APOBEC3G	S	GGTCAGAGGACGGCATGAGA	60	Invitrogen
	AS	GCAGGACCCAGGTGTCATTG		
IDO	S	TACCATCTGCAAATCGTGACTAAGT	60	Invitrogen
	AS	GAAGGGTCTTCAGAGGTCTTATTCTC		
CXCL10	S	GAAATTATTCCTGCAAGCCAATTT	54	Invitrogen
	AS	TCACCCTTCTTTTCATTGTAGCA		
NOD2	S	AGCCATTGTCAGGAGGCTC	60	Invitrogen
	AS	CGTCTCTGCTCCATCATAGG		
IRF1	S	TTCCCTCTTCCACTCGGAGT	58	Invitrogen
	AS	GATATCTGGCAGGGAGTTCA		
PKR	S	TCTTCATGTATGTGACACTGC	58	Invitrogen
	AS	CACACAGTCAAGGTCCTTAG		
Mx1	S	ATTCGGATGCTTCAGAGGTAGA	54	Invitrogen
	AS	CCCGGCGATGGCATT		
Programme	Initiation: 95°C 10 min; 40 cycles: 95 °C 15 sec.; Tm variable selon l'amorce 30 sec.; 72°C 30sec; Terminaison: 72°C 10min			

Essais de l'activité rapporteuse de la luciférase

Les cellules U3A ont été cotransfectées à une confluence de 90%, avec 100ng de l'un des plasmides rapporteurs luciférase (données généreusement par Dr. David Proud, Calgary) suivant: IP10prom-977pb, IP10prom-376pb, IP10prom977pb- Δ ISRE(3), IP10prom977pb- Δ NFkB(1), IP10prom977pb- Δ NFkB(2), IPprom977pb- Δ AP-1 (décrits dans la section résultats) et avec 50ng de plasmide exprimant la rénilla-luciférase (contrôle interne), pendant 8 heures. Pour chaque construction de plasmide, l'expérience a été effectuée en triplicata indépendant. Une heure avant la transfection, le milieu de culture a été remplacé. Lors de la transfection, la lipofectamine 2000 (Thermo Fisher, États-Unis) a été ajouté aux complexes contenant le plasmide avec un ratio 1: 2. Pour chaque triplicata 50 μ L d'OptiMEM (Invitrogen, Thermo Fisher, États-Unis) a été ajouté à chacun des plasmides. Trois mélanges contenant 50 μ L/transfection d'OptiMEM ont été ajoutés à la lipofectamine 2000 de manière indépendante et incubé à température pièce pendant 5 minutes. Ces derniers ont par la suite été ajouté aux plasmides et ajouté goutte par goutte dans les plaques de culture cellulaire et ils ont été incubés à 37°C pendant 24 heures. Par la suite, une costimulation par TNF α +IFN β (10ng/mL;1000U/mL) a été faites pendant 16 heures et nous avons mesuré l'activité luciférase. Plus précisément, si les régions régulatrices sont essentielles à la transcription, la luciférase sera exprimée et va hydrolyser la luciférine et provoquer la libération d'un photon. Pour la normalisation, nous avons cotransfecté les cellules avec un plasmide contenant la luciférase firefly avec la luciférase rénilla, la normalisation se fait sous la forme d'un rapport luciférase/rénilla. Afin de s'assurer de la validité de l'activité luciférase, un contrôle négatif avec la construction (IP10prom-977pb) a été réalisé sur des cellules non stimulées par TNF α +IFN β .

Chapitre 3: Résultats

3.1.0 Déterminer l'importance de la voie de signalisation dépendante de STAT2 et IRF9, indépendamment de STAT1, dans la régulation d'un programme transcriptionnel antiviral et immunorégulateur en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β .

Une étude récente réalisée au laboratoire du Dr. Nathalie Grandvaux a démontré que l'expression de DUOX2 est induite par l'action synergique entre TNF α +IFN β , Cette étude a permis de démontrer que l'induction de DUOX2 est dépendante d'une nouvelle voie de signalisation impliquant STAT2 et IRF9, mais qui est indépendante de STAT1 [44]. Notre objectif premier était de déterminer si cette nouvelle voie de signalisation contrôle l'expression d'autres gènes antiviraux et immunorégulateurs pour déterminer sa fonction. D'autre part, pour démontrer que la régulation de DUOX2 était indépendante de STAT1, une stratégie basée sur des ARNi avait été utilisée dans l'étude originale [44]. Cependant, avec une stratégie par ARNi, il n'est pas possible d'exclure complètement une expression résiduelle, même mineure, de STAT1 qui pourrait être suffisante pour médier une réponse transcriptionnelle suite à la costimulation par TNF α +IFN β . Pour confirmer de manière absolue que cette voie est indépendante de STAT1, nous avons choisis de travailler avec des cellules déficientes en STAT1. Nous avons le choix entre deux modèles: 1- une lignée de fibroblastes humains, la lignée U3A dérivée de la lignée 2ftGH par mutagenèse [53] ; 2- des cellules épithéliales issues de souris STAT1^{-/-} [54]. Le système immunitaire du tractus respiratoire murin diffère substantiellement du système humain. Nous avons donc choisi de réaliser notre étude en utilisant la lignée humain U3A [55]. Nous avons abordé les questions suivantes:

- Quel est le profil d'induction de gènes immunorégulateurs et antiviraux en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β dans les cellules épithéliales pulmonaires ?
- Est-ce que l'induction synergique des gènes en réponse à TNF α +IFN β est indépendante de STAT1 ? Cette étude a été réalisée dans les cellules U3A.

- Est-ce que l'induction synergique des gènes en réponse au TNF α +IFN β est dépendante de STAT2 et IRF9 ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la technique d'ARNi contre STAT2 et IRF9 dans la population de cellules U3A.
- Finalement, nous voulions déterminer si l'expression des gènes régulés par la voie dépendante de STAT2 et IRF9 étaient régulés de manière transcriptionnelle en étudiant l'activation du promoteur.

3.1.1 Profil d'expression de gènes immunorégulateurs et antiviraux en réponse à TNF α , IFN β ou à TNF α +IFN β

Afin de déterminer le profil d'induction de gènes en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β dans les cellules épithéliales pulmonaires, nous avons sélectionné un panel de gènes immunorégulateurs et antiviraux décrits dans la littérature pour être induits soit par le TNF α ou l'IFN β [35, 56–58]: *MX1*, *IDO*, *APOBEC3G*, *CXCL10*, *NOD2*, *IRF1* et *PKR*. *DUOX2*, déjà décrit comme étant régulé de manière synergique entre TNF α +IFN β a également été ajouté à l'étude. Parmi ces gènes, *APOBEC3G*, *PKR*, *MX1* et *CXCL10*, ont également été décrits comme des gènes pouvant être exprimé de manière indépendante de STAT1 en réponse aux IFN de type I (α/β) et II (γ) [40, 59].

Nous avons stimulé des cellules A549 par TNF α seul (10ng/mL), par IFN β seul (1000U/mL) ou par TNF α +IFN β (10ng/mL;1000U/mL) pendant 3, 6, 16 et 24 heures. Aux différents temps, l'ARN total a été extrait et l'expression relative des différents gènes a été quantifiée au niveau de l'ARNm par qRT-PCR. L'analyse du profil d'expression des gènes sélectionnés (figure 3-1) nous révèle deux catégories distinctes d'induction par les différentes cytokines. Les résultats (figure 3-1.1) ont montré que la costimulation des cellules par TNF α +IFN β induit de manière synergique l'expression de *DUOX2*, *IDO*, *APOBEC3G*, *CXCL10*, *NOD2* et *IRF1*. L'expression de *DUOX2*, *IDO*, *APOBEC3G*, *CXCL10* se fait tardivement, soit à partir de 9 heures post-stimulation comparativement à l'expression de

NOD2 et *IRF1* où l'on voit la quantité d'ARNm plafonner dès trois heures post-stimulation leurs quantité d'ARNm plafonne jusqu'à 24 heures post-stimulation. L'action synergique entre $TNF\alpha+IFN\beta$ permet d'augmenter de manière significative le niveau d'expression d'ARNm de *DUOX2*, *IDO*, *APOBEC3G*, *CXCL10*, *NOD2*, *IRF1* et *CXCL10* comparativement à la stimulation unique par l' $IFN\beta$ ou le $TNF\alpha$. La stimulation par le $TNF\alpha$ seul induit transitoirement l'expression de *NOD2* et *IRF1* dès trois heures post-stimulation pour ensuite diminuer. De plus, leurs expressions sont également induites dans les temps courts post-costimulation par $TNF\alpha$ et $IFN\beta$ comparativement à l'expression de *DUOX2*, *IDO* et *APOBEC3G*. *DUOX2*, *IDO*, *APOBEC3G*, *NOD2* et *IRF1* sont induits faiblement par la stimulation de l' $IFN\beta$ seul comparé aux gènes induits par la costimulation du $TNF\alpha$ et $IFN\beta$. Les gènes *MXI* et *PKR* ne sont pas exprimés en réponse au $TNF\alpha$ seul. Par contre, la stimulation des cellules par l' $IFN\beta$ seul permet l'induction de *MXI* et de *PKR*. Il est important de noter que suite à la costimulation du $TNF\alpha+IFN\beta$, le profil d'expression de *MXI* et de *PKR* est semblable à celui des cellules stimulées par l' $IFN\beta$ seul. Ce résultat indique que ces gènes ne répondent pas de manière synergique à la costimulation (figure 3-1.1).

L'ensemble de ces résultats, nous ont permis de regrouper les gènes *IDO*, *APOBEC3G*, *DUOX2*, *CXCL10*, *NOD2*, *IRF1*, *MXI* et *PKR* en fonction de leur réponse aux cytokines, c'est-à-dire ceux qui sont induits par la stimulation du $TNF\alpha$ seul, l' $IFN\beta$ seul ou par la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$. Le diagramme de venne présenté à la figure 3-1.1.1 indique qu'aucun des gènes étudié n'est induit exclusivement par la stimulation par le $TNF\alpha$ seul. Deux gènes, *MXI* et *PKR*, sont exprimés seulement en réponse à l' $IFN\beta$. *NOD2* et *IRF1* répondent à la fois à la stimulation unique du $TNF\alpha$, de l' $IFN\beta$ et à la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$ dans les temps court, c'est-à-dire 3 heures post-stimulation. Trois gènes, *IDO*, *DUOX2* et *APOBEC3G*, sont induits par $IFN\beta$ et sont induit tardivement de manière synergique entre $TNF\alpha+IFN\beta$. *CXCL10* est exprimé uniquement tardivement par la costimulation du $TNF\alpha+IFN\beta$. Cette expérience nous a permis d'identifier des gènes qui répondent tardivement de manière synergique à la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$ dans les cellules épithéliales, c'est-à-dire *IDO*, *APOBEC3G* et *CXCL10* et tel qu'attendu *DUOX2*.

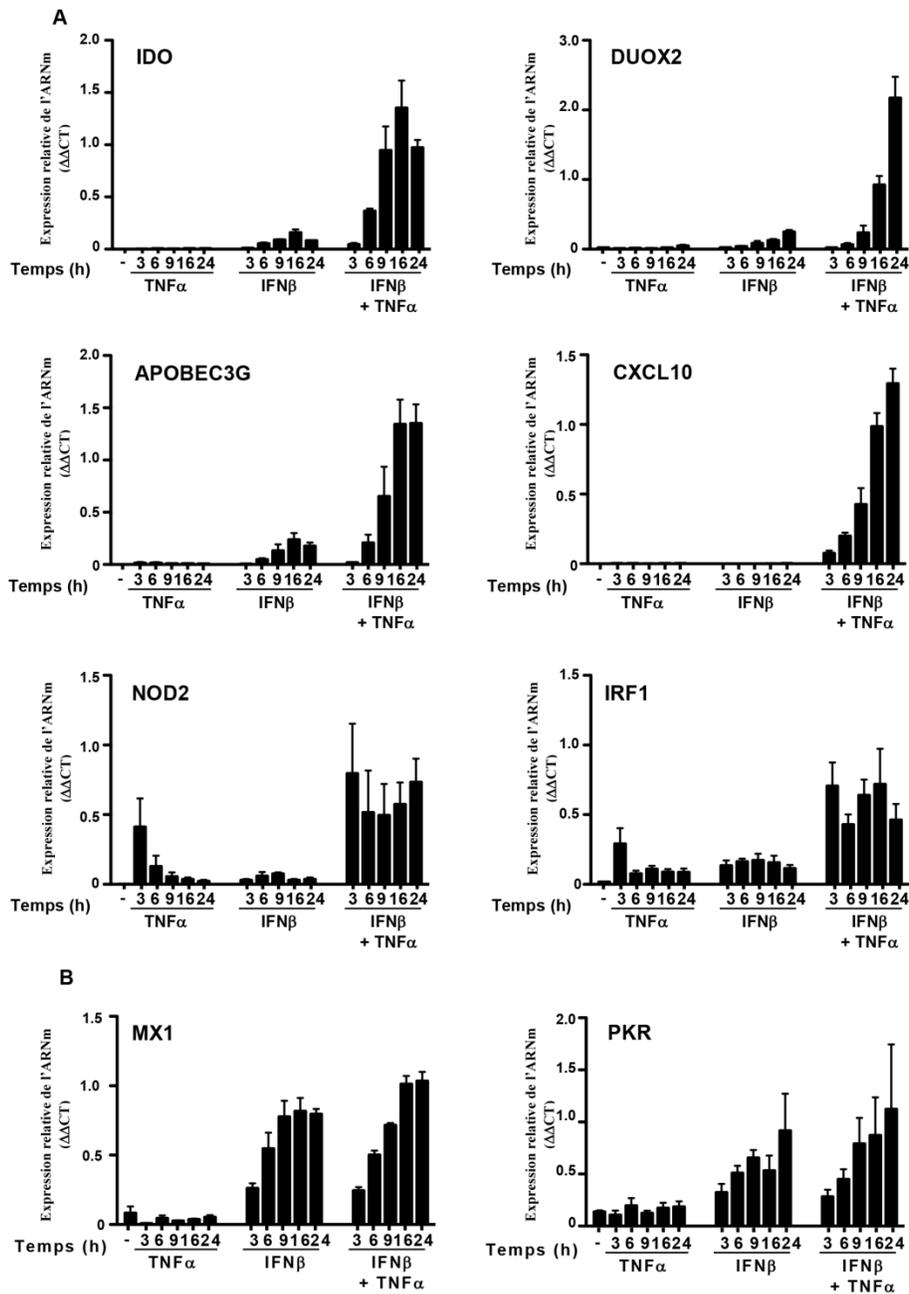


Figure 3-1.1: Gènes immunorégulateurs et antiviraux induits par TNFα seul, IFNβ seul ou par l'action synergique du TNFα+IFNβ

Des cellules A549 ont été stimulées soit par TNFα (10ng/mL) seul, de par IFNβ (1000U/mL) seul ou costimulées par TNFα+IFNβ (10ng/mL;1000U/mL) aux temps indiqués. La quantification des ARNm ont été faite par qRT-PCR et exprimés en quantité relative (ΔΔCT) après normalisation avec l'ARNm S9. Moyenne +/- SEM, (n=4). Figure réalisée avec la collaboration de Mario Kalamuji,.

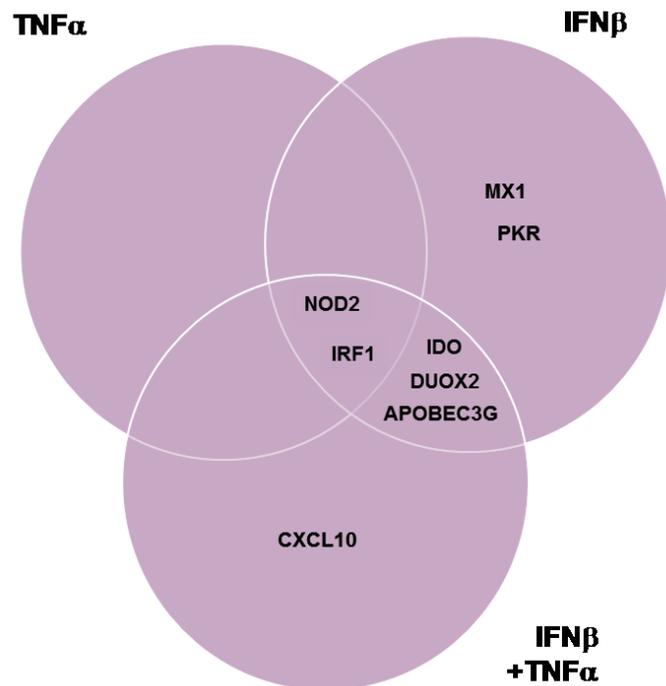


Figure 3-1.1.1: Diagramme de Venn représentant la classification d'induction de *Mx1*, *PKR*, *NOD2*, *IRF1*, *IDO*, *DUOX2*, *APOBEC3G* et *CXCL10* en fonction de la réponse à la stimulation des cellules A549 par le $TNF\alpha$ seul, par l' $IFN\beta$ seul ou par $TNF\alpha+IFN\beta$.

3.1.2 Analyse de l'expression des gènes induits de manière synergique en réponse à $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ dans des cellules déficientes en STAT1.

Nous avons pour objectif de déterminer si l'induction des gènes immunorégulateurs et antiviraux trouvés pour répondre à la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ de manière synergique est également médiée par la voie de signalisation indépendante de STAT1, préalablement identifiée dans l'étude de la régulation de *DUOX2* [44]. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle de cellules U3A.

3.1.2.1 Validation du modèle de cellules U3A

Nous avons tout d'abord vérifié que les cellules U3A étaient bien déficientes en STAT1. Nous avons analysé comme contrôle les cellules U3AR, des cellules U3A dans lesquelles STAT1 a été exprimé à nouveau de manière stable. Comme nous voulions étudier la voie de signalisation induite par la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$, qui selon l'étude de l'expression de *DUOX2* est dépendante de STAT2 et IRF9, il était important de valider si STAT2 et IRF9 étaient exprimés dans les cellules U3A et pouvaient être activés. Afin de vérifier ces paramètres, nous avons analysé des extraits protéiques de U3A et de U3AR issus de cellules non stimulées et stimulées par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ pendant 2, 16, 24 et 32 heures. Nous avons séparé les protéines par électrophorèse SDS-PAGE suivi d'une analyse par immunobuvardage. Les immunobuvardages (figure 3-1.2.1A) confirment l'absence totale de STAT1 dans les U3A comparativement aux U3AR. STAT2 est exprimé dans les deux types cellulaires, bien qu'à un niveau moindre dans les cellules U3A. L'activation de STAT2, analysée par la détection de la phosphorylation de la tyrosine 690, est induite par la costimulation du $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ (10ng/mL;1000U/mL) dans les deux types cellulaires. L'induction de IRF9, qui traduit son activation, en réponse à $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ est également observée dans les deux types cellulaires. Ces résultats confirment que STAT2 et IRF9 sont présents et activables dans les cellules U3A en réponse à $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$, validant de ce fait l'utilisation des U3A pour notre étude.

3.1.2.2 Analyse de l'expression de *CXCL10*, *APOBEC3G* et *IDO* en réponse à la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ dans les cellules U3A.

Nous avons utilisé les cellules U3A et U3AR pour étudier l'expression de *DUOX2*, *CXCL10*, *APOBEC3G* et *IDO*, trouvés précédemment, pour répondre à l'action synergique à la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ dans les cellules A549. Pour ce faire, nous avons stimulé des cellules U3A et U3AR par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ (10ng/mL;1000U/mL) pendant 16 et 24 heures puisque nous avons déterminé précédemment que *DUOX2*, *CXCL10*, *IDO* et *APOBEC3G* sont induit tardivement en réponse à la costimulation (figure 3-1.2.1). Aux différents temps, l'ARN total a été extrait et l'expression relative des différents gènes a été quantifiée au niveau de l'ARNm par qRT-PCR en valeurs relatives ($\Delta\Delta\text{CT}$).

- Les analyses obtenues pour l'expression de *DUOX2* lors de la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ (résultats non montrés) nous ont confirmé que *DUOX2* n'est pas inductible dans les cellules U3A. Ceci est conforme à la littérature décrivant *DUOX2* comme un gène exprimé spécifiquement dans les cellules épithéliales [60].
- Les résultats présentés à la figure 3-1.2.1B démontrent que dans les cellules U3A stimulées pendant 24 heures, nous observons une stimulation de 42.6X de l'expression de *CXCL10* par rapport aux cellules non-stimulées. L'observation que *CXCL10* est induit 2695X en comparaison dans les cellules U3AR suggère, tel que décrit dans la littérature, qu'il existe également une voie d'activation de l'expression dépendante de STAT1 [57, 61, 62].
- *APOBEC3G* est présent dans les cellules U3A non-stimulées et est augmenté de 50% à 24 heures post-stimulation comparativement aux cellules non-stimulées. Il est à noter que le seuil d'induction significatif d'un gène est généralement considéré comme étant au minimum de 2X. Plusieurs papiers ont démontré que *APOBEC3G* est également exprimé par la voie de signalisation dépendante de STAT1 [40, 63] ce qui reflète probablement l'augmentation de l'expression de *APOBEC3G* de 6.6X dans les cellules U3AR, 24 heures après la costimulation par rapport aux cellules non stimulées (figure 3-1.2.1B).

- Les analyses obtenues pour l'expression de IDO ont révélé que les niveaux d'expression n'est pas reproductible. Les résultats n'ont donc pas été pris en considération.

Ces résultats démontrent que les gènes *CXCL10*, *APOBEC3G* sont inductibles lors de la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$ dans les cellules déficientes en STAT1. Ceci confirme qu'il existe une voie de signalisation indépendante de STAT1 induite par la costimulation du $TNF\alpha+IFN\beta$ favorisant l'expression de gènes immunorégulateurs et antiviraux.

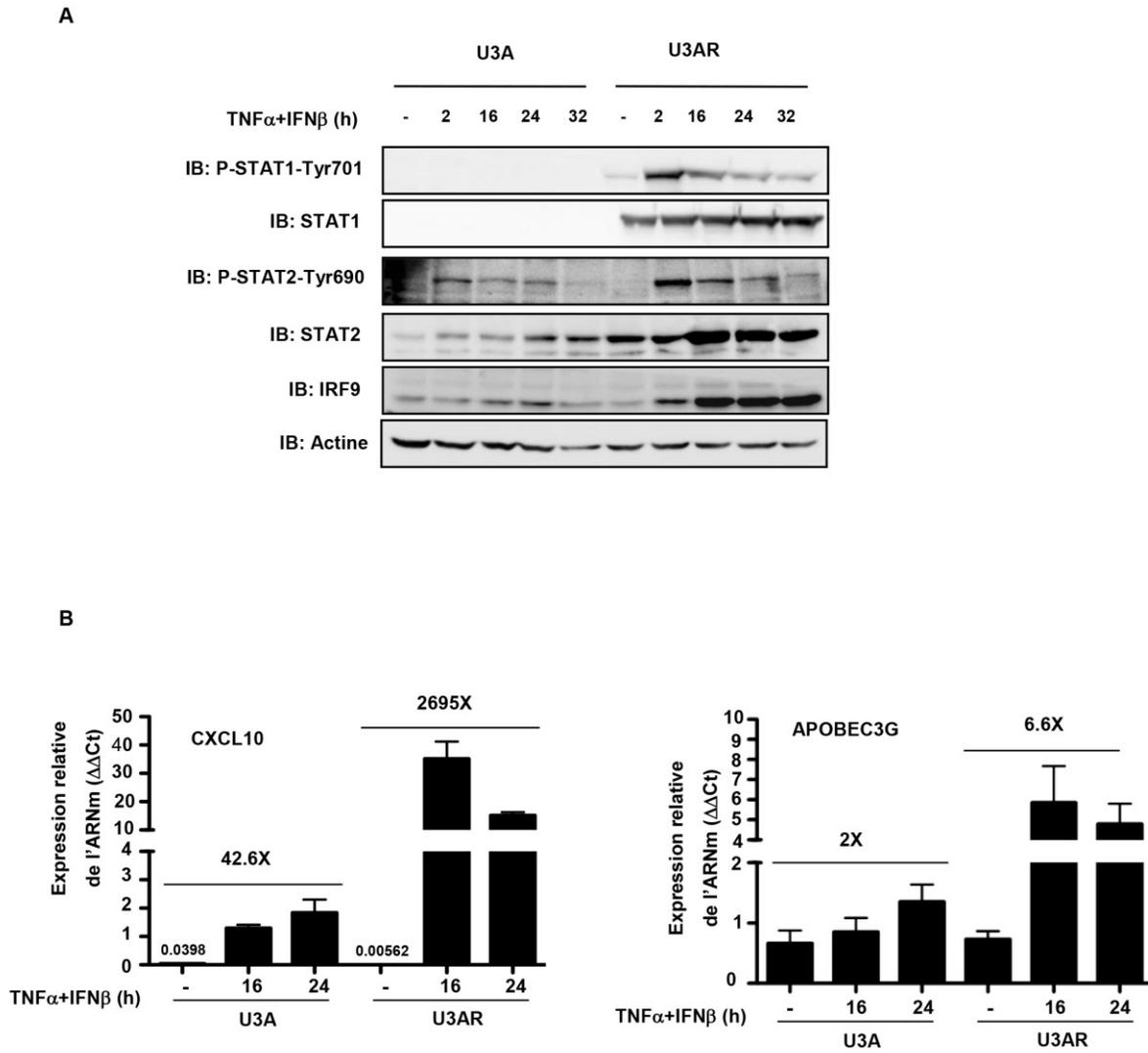


Figure 3-1.2.1: CXCL10 et APOBEC3G sont induits par la costimulation du TNFα+IFNβ, indépendamment de STAT1

Des cellules U3A (déficientes en STAT1) et U3AR (U3A exprimant STAT1 de manière stable) ont été stimulées par TNFα+IFNβ (10ng/mL;1000U/mL) pendant les temps indiqués. **(A)** Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE et l'expression des protéines de STAT1-P-Tyr701, STAT1, STAT2-P-Tyr690, STAT2, IRF9 ont été analysés par immunoblot (IB). Les données sont représentatives de trois expériences différentes avec des résultats similaires. **(B)** La quantification des ARNm ont été faite par qRT-PCR et exprimé en quantité relative (ΔΔCt) après normalisation avec l'ARNm S9. Moyenne +/- SEM, (n≥4). *Figure réalisée avec la collaboration de Mario Kalamujic.*

3.1.2.3 Étude du rôle de STAT2 et IRF9 dans l'expression de *CXCL10* et *APOBEC3G* en réponse à la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ dans les cellules déficientes en STAT1

Nous avons établi que la voie de signalisation activée par la costimulation du $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ permet l'expression de *CXCL10* et *APOBEC3G* de manière indépendante de STAT1. Notre objectif suivant était de déterminer si l'expression de *CXCL10* et *APOBEC3G* implique les protéines STAT2 et IRF9 comme cela a préalablement été démontré pour l'expression de *DUOX2*. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie basée sur des ARNi. Des cellules U3A ont été transfectées avec des ARNi contrôle ou ciblant spécifiquement STAT2 ou IRF9. Après 48 heures de transfection, nous avons costimulé ces cellules par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ (10ng/mL;1000U/mL) pendant 24 heures, puis les ARNm ont été quantifiés par qRT-PCR en valeurs absolues. Nous avons également analysé les extraits protéiques par électrophorèse SDS-PAGE suivi d'une analyse par immunobuvardage.

L'analyse de l'immunobuvardage présenté à la figure 3.1.2.3A a permis de valider l'efficacité d'inhibition de l'expression de STAT2 et de IRF9. Les résultats démontrent une diminution très significative de l'expression de STAT2 et de IRF9 dans les cellules transfectées avec les ARNi correspondants et costimulées par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ comparativement aux cellules contrôles. L'analyse des ARNm présentée à la figure 3.1.2.3B démontre:

- une expression basale de *APOBEC3G* dans les cellules U3A qui est augmentée de 45% par la costimulation du $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$. Par contre, lorsque l'expression de STAT2 ou de IRF9 est inhibée, l'expression de *APOBEC3G* suite à la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ reste au niveau d'expression basal.
- l'induction de l'expression de *CXCL10* dans les cellules costimulées par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ est quantifiée à 12998 copies \pm 6%, ce qui équivaut à une augmentation de 93% comparée aux cellules contrôles non stimulées. Dans les cellules dans lesquelles l'expression de STAT2 ou IRF9 est inhibée avant la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$, l'expression de *CXCL10* est quantifiée à 1914 et 2659 copies \pm 6%,

correspondant à 90% et 85% par rapport aux cellules contrôles costimulées, respectivement.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de démontrer que l'expression tardive de *APOBEC3G* et *CXCL10* suite à l'induction par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ met en jeu une voie de signalisation impliquant STAT2 et IRF9. Ceci indique que la voie de signalisation dépendante de STAT2 et IRF9 mais indépendante de STAT1 en aval de $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ n'est pas restreinte à la régulation de *DUOX2*, mais contrôle d'autres gènes antiviraux et immunorégulateurs.

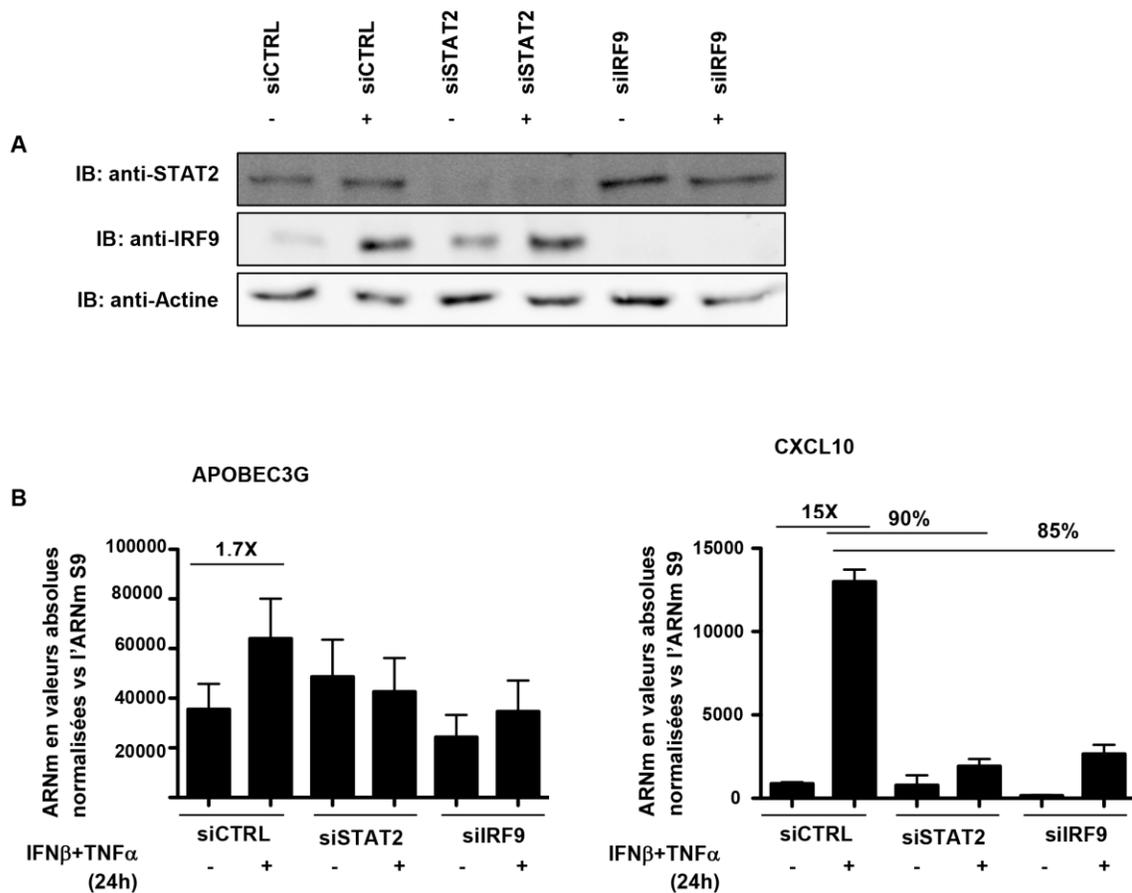


Figure 3-1.2.3: L'expression de *APOBEC3G* et de *CXCL10*, est dépendante de la voie de signalisation STAT2/IRF9

Des cellules U3A (déficientes en STAT1) ont été transfectées avec un siCTRL, siSTAT2 ou siIRF9 pendant 48 heures avant d'être stimulées par TNF α +IFN β (10ng/mL;1000U/mL) pendant 24 heures. **(A)** Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE et l'expression des protéines de STAT2 et de IRF9 ont été analysés par immunoblot (IB) afin de valider la transfection. Les données sont représentatives de trois expériences différentes avec des résultats similaires. **(B)** La quantification des ARNm ont été faite par qRT-PCR et exprimés en valeurs absolues après normalisation avec l'ARNm S9. Moyenne +/- SEM, (n \geq 4).

3.1.2.4 Déterminer si l'induction synergique en réponse à TNF α +IFN β implique une régulation transcriptionnelle des gènes antiviraux et immunorégulateurs

Nos expériences précédentes nous ont permis de confirmer que l'induction synergique de gènes antiviraux et immunorégulateurs par TNF α +IFN β implique une régulation par les protéines STAT2 et IRF9. Tel que décrit ci-dessus l'expression des gènes induits par TNF α +IFN β est tardive comparée aux gènes stimulés par IFN β seulement (figure 3 -1.1). Cette observation pose la question du mécanisme mis en jeu. Nous avons donc voulu confirmer si l'induction observée résulte d'une régulation transcriptionnelle. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des essais de gènes rapporteurs en utilisant différentes constructions de plasmides (données généreusement par Dr. David Proud, Calgary) contenant le promoteur de *CXCL10*, ou des versions mutées ou tronquées, en amont du gène firefly luciférase (figure 3.1.2.4) [64]:

- une construction contenant la séquence complète du promoteur de *CXCL10*: IP10prom-977pb
- une construction contenant une délétion de la région distale du site d'initiation de la transcription qui contient deux sites consensus ISRE: ISRE (1) et ISRE (2) de liaison des IRF: IP10prom-376pb
- une construction contenant une mutation du site ISRE proximal: IP10prom-977pb- Δ ISRE (3)
- deux constructions contenant chacune une mutation dans l'un des sites de liaison pour NF κ B dans la région proximale du site de liaison: IP10prom-977pb- Δ NF κ B (1) et IP10prom-977pb- Δ NF κ B (2)
- une construction contenant une mutation au site de liaison d'AP-1: IP10prom-977pb- Δ AP-1

Au total, six groupes de cellules U3A déficientes en STAT1 ont été cotransfectés par l'une des constructions luciférase (100ng) décrite ci-dessus et un plasmide contrôle permettant l'expression de la rénilla-luciférase (50ng) servant de contrôle interne pour normaliser le niveau de transfection. Après 8 heures de transfection, les cellules ont été

stimulées par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ (10ng/mL;1000U/mL) pendant 16 heures, puis nous avons mesuré les activités luciférase (firefly et renilla).

Les résultats obtenus (figure 3.1.2.4.1) démontrent que dans les cellules qui ont été transfectées avec le plasmide contenant le promoteur complet de *CXCL10* (IP10prom-977pb), la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ induit une augmentation de l'activité luciférase de 3.16X par rapport aux cellules non stimulées. Cette observation indique que l'induction des gènes en réponse à la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ se fait au moins en partie par une régulation au niveau transcriptionnelle.

L'analyse des constructions mutées ou tronquées a conduit aux résultats suivants:

- Il n'y a pas de différence significative de l'activité luciférase dans les cellules costimulées contenant la construction IP10prom-376pb par rapport aux cellules costimulées transfectées avec la construction contenant le promoteur complet (IP10prom-977pb). Ceci indique que les deux sites ISRE distaux, ISRE(1), ISRE(2), ne sont pas impliqués dans la régulation de *CXCL10*, en réponse au $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$.
- Il n'y a pas de différence significative de l'activité luciférase dans les cellules costimulées contenant la construction IP10prom-977pb- Δ AP-1 par rapport aux cellules costimulées transfectées avec la construction contenant le promoteur complet (IP10prom-977pb). Ceci indique que le site AP-1 n'est pas impliqué dans la régulation de *CXCL10*, en réponse au $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$.
- Par contre, nous observons une diminution de 51% de l'induction de l'activité du promoteur au $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ lorsque la séquence ISRE(3) est mutée (IP10prom-977pb- Δ ISRE(3)).
- De même, une mutation dans l'une ou l'autre des séquences de liaison de $\text{NF}\kappa\text{B}$, $\text{NF}\kappa\text{B}$ (1) et $\text{NF}\kappa\text{B}$ (2) (IP10prom-977pb- Δ $\text{NF}\kappa\text{B}$ (1) et IP10prom-977pb- Δ $\text{NF}\kappa\text{B}$ (2)) cause respectivement une diminution de 49% et 62% de l'activité du promoteur induite par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ comparativement au promoteur entier.

Ainsi, ces résultats démontrent que la régulation transcriptionnelle du promoteur de *CXCL10* par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ dans les cellules U3A déficientes en STAT1 implique les sites ISRE(3), ainsi que les deux sites $\text{NF}\kappa\text{B}$, $\text{NF}\kappa\text{B}(1)$ et $\text{NF}\kappa\text{B}(2)$, de *CXCL10*.

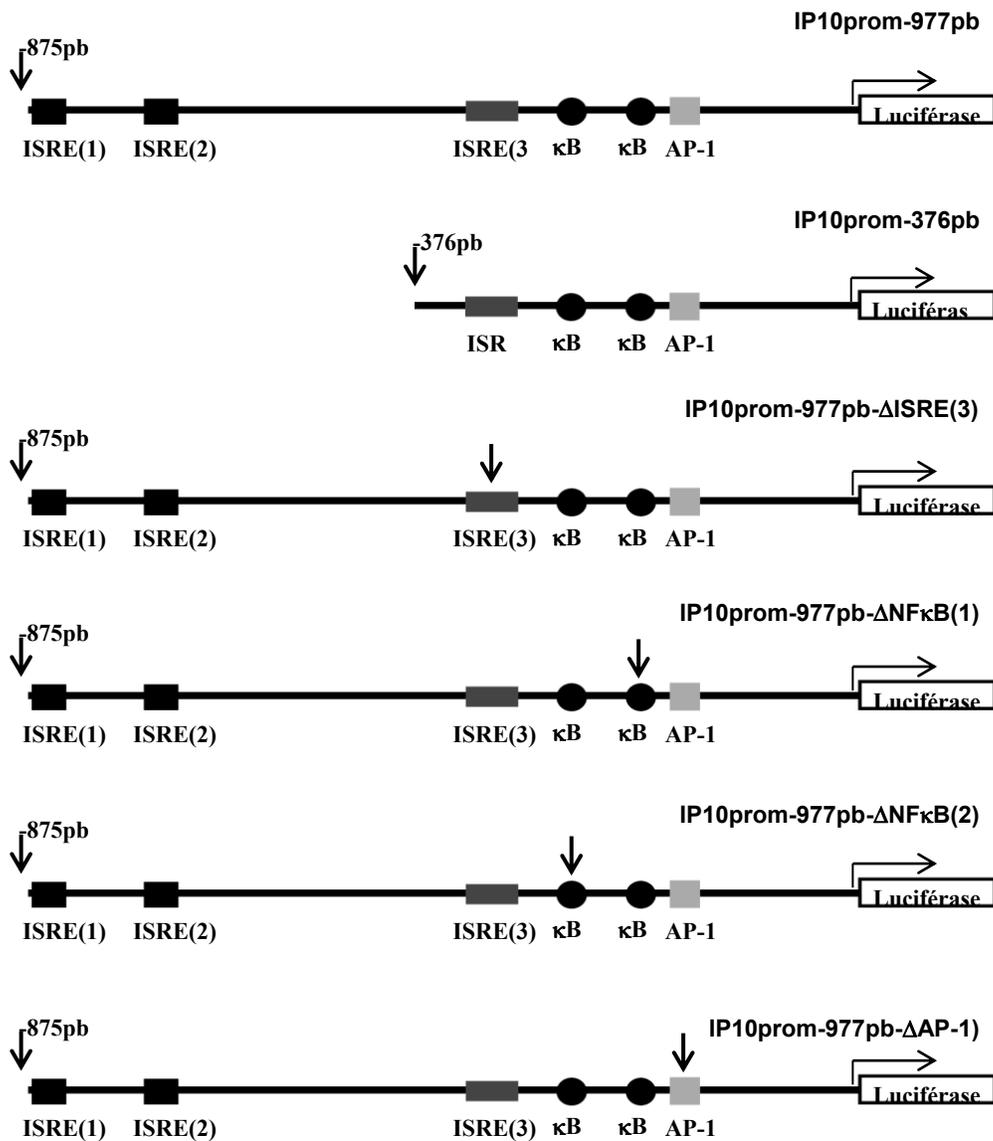


Figure 3-1.2.4: Schéma des constructions du promoteur de *CXCL10* utilisées dans notre étude

Les différentes constructions plasmidiques utilisées pour étudier la régulation transcriptionnelle du promoteur de *CXCL10* sont représentées. Les sites consensus de liaison des facteurs de transcription IRF (ISRE), NFκB et AP-1 sont indiqués. Les flèches au-dessus des sites indiquent les sites mutés dans la construction correspondante. Schéma adapté de *AM. J. Physiol. Lung Cell. Mol Physiol* [64]. Avec la permission de The American Physiological Society.

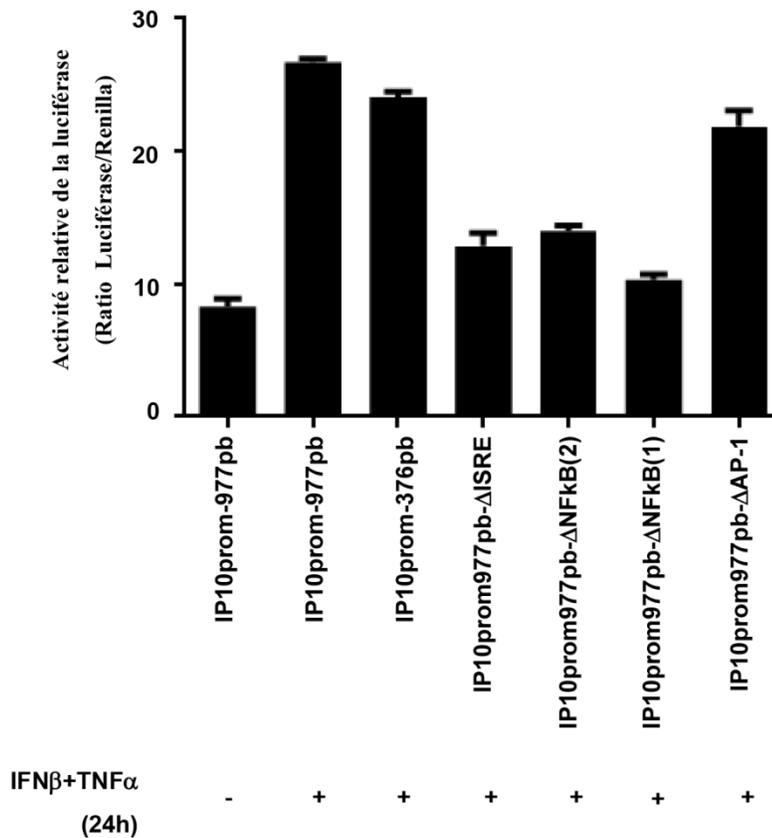


Figure 3-1.2.4.1: L'activité transcriptionnelle du promoteur de *CXCL10* induite par $TNF\alpha+IFN\beta$ implique les séquences de liaison ISRE(3), $NF\kappa B(1)$ et $NF\kappa B(2)$.

Des cellules U3A ont été cotransfectées avec 100ng de l'un des plasmides rapporteurs luciférase suivant: IP10prom-977pb, IP10prom-376pb, IP10prom977pb-ΔISRE(3), IP10prom977pb-ΔNFκB(1), IP10prom977pb-ΔNFκB(2) ou IPprom977pb-ΔAP-1 et avec 50ng de plasmide contenant la rénilla-luciférase (contrôle interne), pendant 8 heures. Par la suite les cellules ont été stimulées par $TNF\alpha+IFN\beta$ (10ng/mL;1000U/mL) pendant 16 heures avant de mesurer les activités luciférase. Les résultats ont été normalisés par rapport à la rénilla luciférase. Chaque valeur représente la moyenne +/- SEM de triplicata d'un échantillon indépendant. Les données sont représentatives de trois expériences différentes avec des résultats similaires. *Figure réalisée avec la collaboration d'Élise Caron.*

3.2.0 Est-ce que STAT6, qui est un régulateur connu de *DUOX2* en réponse à IL4+IL13, est impliqué dans l'induction de *DUOX2* en réponse à la costimulation par TNF α + IFN β ?

Nous nous sommes intéressés à déterminer si une autre protéine pouvait remplacer la fonction de STAT1 dans la voie de signalisation dépendante de STAT2 et d'IRF9 qui est induite par la synergie du TNF α +IFN β . STAT6 est connu pour être important dans la réponse immunitaire antivirale, il est activé par plusieurs cytokines en plus des acides nucléiques viraux [65], mais aucune étude à ce jour a démontré son activation par le TNF α ou l'IFN β . De plus, plusieurs études permettent de sélectionner STAT6 comme une protéine possiblement impliquée dans la voie de signalisation dépendante de STAT/IRF9 lors de la costimulation par TNF α +IFN β : 1) Il a été démontré que STAT6 peut former un complexe transcriptionnel avec STAT2 [66] 2) STAT6 est un régulateur de l'expression de *DUOX2* lors de la costimulation par IL4+IL13 [67].

3.2.1 Déterminer le rôle de STAT6 dans la voie de signalisation induite par le TNF α +IFN β

Afin de vérifier si STAT6 est impliqué dans la voie de signalisation induite par la synergie entre TNF α et IFN β , nous avons inhibé l'expression de STAT6 dans les cellules A549. Un premier groupe de cellules a été transfecté avec des ARNi contrôle (siCTRL). Deux autres populations de cellules ont été transfectées individuellement avec deux séquences d'ARNi différentes dirigées contre STAT6, siSTAT6(1) et siSTAT6(2). Le but d'utiliser deux séquences différentes d'ARNi contre STAT6 est de confirmer que le phénotype observé n'est pas dû à un effet "off-target" d'un des ARNi. Pour terminer, un dernier groupe cellulaire a été transfecté avec des ARNi contre IRF9. Cette condition sert de contrôle positif pour s'assurer de l'efficacité de l'inhibition de l'expression de *DUOX2* par un ARNi connu [44]. La stimulation par TNF α +IFN β a été réalisée 48 heures après la transfection des ARNi. À 16 heures suivant la costimulation, les protéines et les ARN totaux ont été extraits. L'efficacité de

la transfection des ARNi contre STAT6 et IRF9 a été validée par immunobuvardage et l'expression de DUOX2 a été quantifiée par qRT-PCR en valeurs absolues.

La figure 3-2.1A montre un immunobuvardage confirmant l'efficacité de l'inhibition de l'expression de STAT6 et IRF9. Les résultats démontrent que dans le groupe de cellules non stimulées qui a été transfecté avec chacun des ARNi contre STAT6, nous observons une diminution très significative de l'expression de STAT6 par rapport aux cellules contrôles transfectées avec siCTRL non stimulées. Dans le groupe de cellules non stimulées transfectées avec les ARNi contre IRF9, nous observons une diminution considérable de l'expression d'IRF9. Dans les groupe de cellules transfectées avec un siCTRL et costimulées par $TNF\alpha+IFN\beta$, nous observons une induction de l'expression de STAT6 et IRF9 comparé aux cellules contrôles non-stimulées. De plus, nous observons une inhibition significative de leur expression lorsque les cellules sont transfectées par les ARNi spécifiques contre STAT6 et IRF9 avant la costimulation. Nous pouvons donc conclure que les ARNi utilisés permettent d'inhiber efficacement l'expression de STAT6 et IRF9.

Les résultats de la figure 3-2.1B ne démontrent aucune expression de DUOX2 dans l'ensemble des groupes de cellules non stimulées. La stimulation des cellules contrôles par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ induit l'expression de l'ARNm de DUOX2 quantifiée à 9.5×10^3 copies $\pm 5\%$, ce qui représente une augmentation de 10^5 copies par rapport aux cellules contrôles non stimulées. Dans les cellules transfectées par le siSTAT6(1) et stimulées par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$, l'expression de DUOX2 est quantifiée à $1.54 \times 10^4 \pm 14\%$, et dans les cellules transfectées par siSTAT6(2) stimulées par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$, l'expression s'élève à 4.5×10^4 copies $\pm 0,5\%$. Ces résultats représentent une augmentation de l'expression de DUOX2 de 35% pour les cellules transfectées par siSTAT6(1) et de 78% pour les cellules transfectées par siSTAT6(2) par rapport aux cellules contrôles costimulées. Pour les cellules transfectées par siIRF9, l'induction de DUOX2 par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ diminue de 84% par rapport aux cellules contrôles, conformément à ce qui a été démontré précédemment [44]. De manière inattendue, alors que STAT6 est connu pour être un régulateur positif de l'expression de DUOX2 lors de la costimulation par IL4+IL13, STAT6 semble avoir un impact négatif sur la régulation de l'expression de DUOX2 dans le contexte de la costimulation par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$.

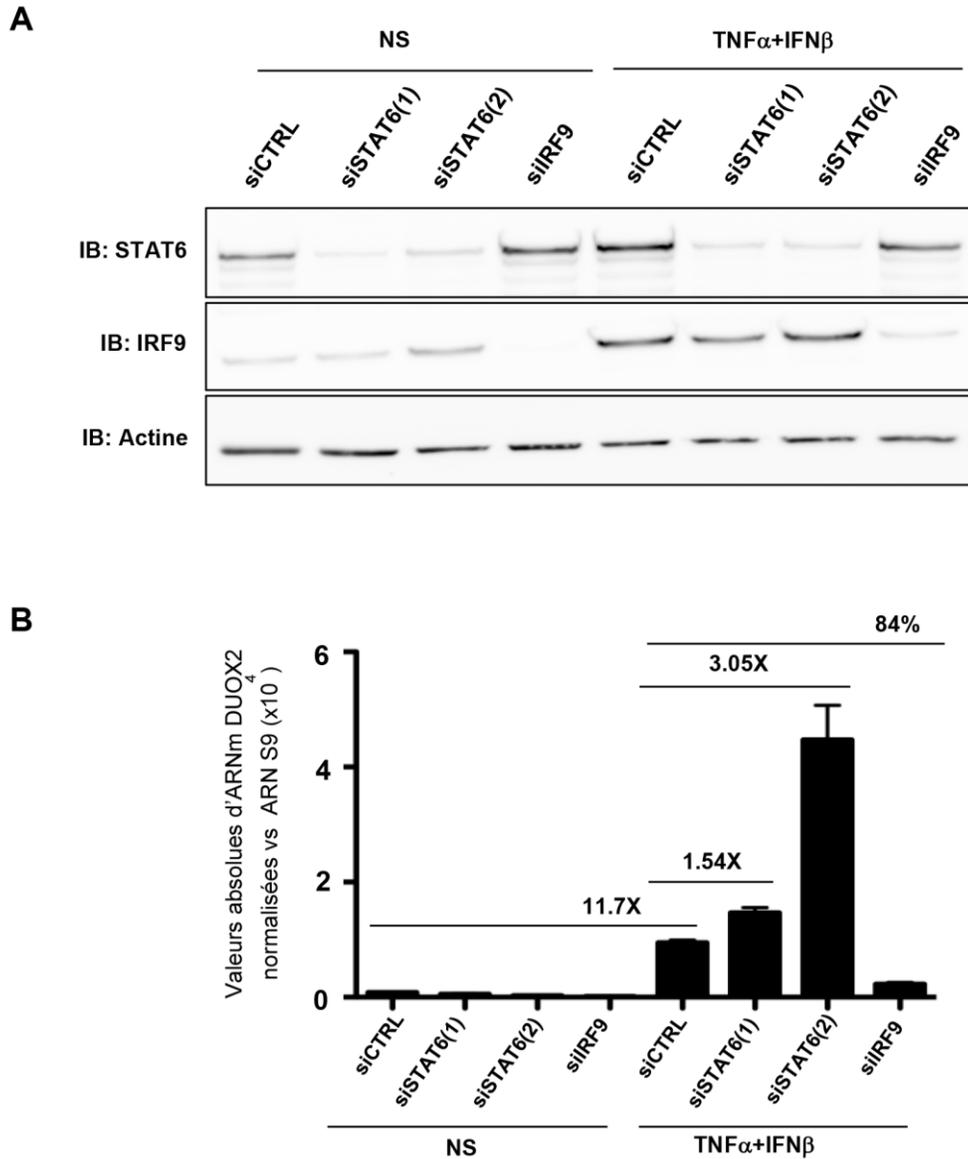


Figure 3-2.1: Analyse du rôle de STAT6 dans la voie de signalisation induite en réponse à la costimulation du TNF α +IFN β

Des cellules A549 ont été transfectées avec un siCTRL ou siSTAT6 (1) ou siSTAT6 (2) ou siIRF9 pendant 48 heures avant d'être stimulées ou non avec du TNF α +IFN β (10ng/mL;1000U/mL) pendant 16 heures. **(A)** Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE et l'expression des protéines de STAT6 et de IRF9 ont été analysés par immunoblot (IB). Les données sont représentatives de trois expériences différentes avec des résultats similaires. **(B)** La quantification des ARNm ont été faite par qRT-PCR et exprimée en valeurs absolues après normalisation avec l'ARNm S9. Moyenne +/- SEM, (n=3).

3.2.2 Déterminer le rôle de STAT6 dans la régulation de DUOX2 dans le contexte d'une infection virale par SeV

SeV est utilisé comme modèle de virus respiratoire de la famille des *Paramyxoviridae*. L'infection des cellules HEK293 par SeV conduit à l'activation de STAT6 par la phosphorylation de la tyrosine 641 [65]. Comme l'expression de DUOX2 a également été rapportée pour être induite lors de l'infection par SeV [44], notre objectif est de déterminer si le rôle de STAT6 dans la régulation de l'expression de DUOX2 dans le contexte d'une infection SeV est similaire à celui observé lors de la costimulation par TNF α +IFN β .

Pour répondre à cette question, nous avons transfecté des cellules A549 afin d'inhiber la production de la protéine STAT6. Un premier groupe de cellules ont été transfecté avec des siCTRL, deux autres populations de cellules ont été transfectées soit avec siSTAT6 (1) et soit par siSTAT6 (2). Un dernier groupe cellulaire a été transfecté par des siIRF9. Ces populations de cellules ont été infectées par SeV (40 hemagglutination units (HAU)/10⁶ cellules), 48 heures après la transfection d'ARNi. Les protéines ont été récoltées après 16 heures d'infection. Les ARNm ont été quantifiés par qRT-PCR en valeurs absolues.

La figure 3-2.2A montre un immunobuvardage confirmant l'efficacité d'inhibition de l'expression de STAT6. Ces résultats démontrent que STAT6 est induit lors de l'infection par SeV. Dans les groupes cellulaires transfectés par les siSTAT6 (1) et siSTAT6 (2), il y a une diminution très significative de l'expression de STAT6. IRF9 est également induit suite à l'infection et son expression est diminuée de manière considérable dans le groupe de cellules transfectées par siIRF9. L'immunobuvardage contre les protéines de SeV (l'expression de la protéine N est montré) démontre que toutes les populations de cellules ont été infectées de manière identique.

Les résultats de la figure 3-2.2B confirme l'induction de DUOX2 en réponse à l'infection par SeV tel que préalablement publié. L'expression de DUOX2 dans les cellules contrôles infectées est quantifiée à 4,6 x 10⁴ copies \pm 3%, représentant une augmentation de

109.9X par rapport aux cellules contrôle non stimulées. Nous n'observons pas de variation significative de l'induction de DUOX2 dans les cellules transfectées par siSTAT6 (1) comparativement aux cellules contrôles infectées. Par contre, nous observons une augmentation de l'expression de DUOX2 de 1,75X dans les cellules infectées SeV et transfectées par les siSTAT6 (2) par rapport aux cellules siCTRL infectées par SeV. Tel qu'attendu, dans les cellules où l'expression de IRF9 est inhibée, il y a une diminution de 51% de l'expression de DUOX2 comparativement aux cellules contrôles infectées. Les résultats obtenus sont plus mitigés que ceux observés dans le contexte de la costimulation par TNF α +IFN β . Compte tenu que l'un des RNAi n'a pas d'effet sur l'induction de DUOX2 et que l'autre induit une augmentation modérée de l'expression de DUOX2, le rôle de STAT6 dans la régulation négative de l'expression de DUOX2 lors de l'infection par SeV semble mineur.

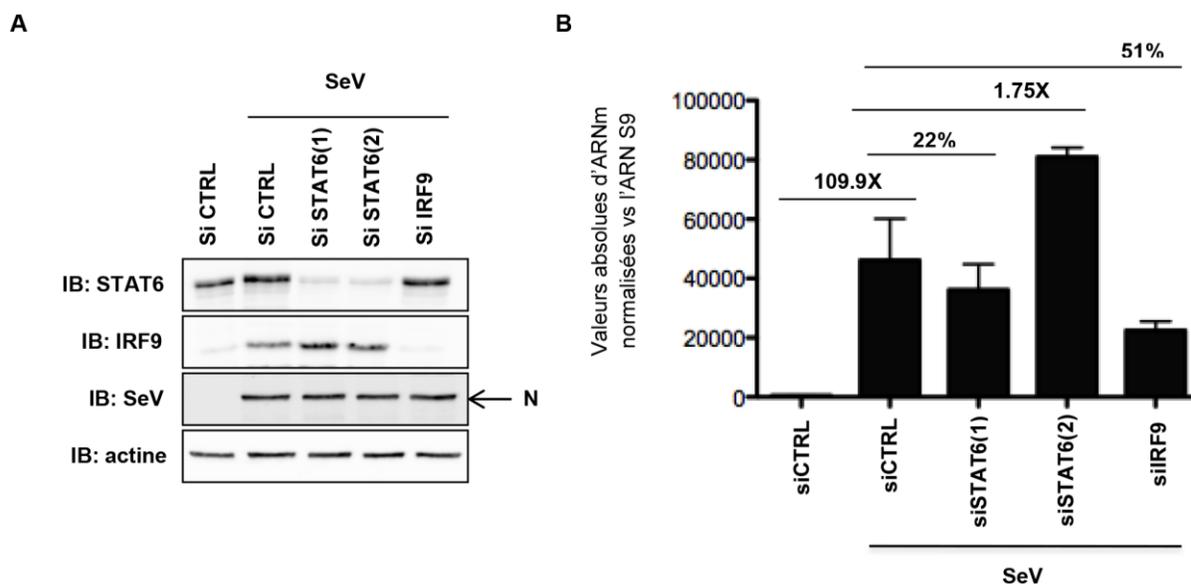


Figure 3-2.2: STAT6, un régulateur négatif de l'expression de *DUOX2* suite à une infection SeV

Des cellules A549 ont été transfectées avec un siCTRL ou un siSTAT6(1) ou un siSTAT6(2) pendant 48 heures avant d'être infectées par SeV (40HAU/10⁶ cellules) pendant 24 heures. **(A)** Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE et l'expression des protéines de STAT6, de IRF9 et SeV ont été analysés par immunoblot (IB). L'anticorps contre SeV est dirigé contre une nucléoprotéine (N). Les données sont représentatives de trois expériences différentes avec des résultats similaires. **(B)** La quantification des ARNm a été faite par qRT-PCR et exprimée en valeurs absolues après normalisation avec l'ARNm S9. Moyenne +/- SEM, (n=3), sauf pour le siCTRL non infectées (n=2).

3.2.3 Cinétique de la phosphorylation de STAT6 dans le contexte d'une costimulation par TNF α +IFN β et d'une infection SeV

Afin de caractériser l'activation de STAT6 en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β et lors d'une infection par SeV, nous avons déterminé la cinétique de phosphorylation de STAT6 sur la tyrosine 641. La phosphorylation de la tyrosine 641 est le mécanisme d'activation de STAT6 le plus décrit à ce jour [65, 68, 69]. Lors d'une infection par SeV dans les cellules HEK293, STAT6 est phosphorylé à partir de 6 heures post-infection et plafonne jusqu'à 12 heures; par la suite, la phosphorylation diminue [65]. Sachant que l'expression de DUOX2 est tardive puisqu'il est exprimé à partir de 9 heures après la costimulation par TNF α +IFN β et lors d'une infection par SeV dans les cellules pulmonaires [44]. Nous avons également étudié l'activation de STAT6 dans les cellules A549 à des temps plus tardifs. Nous avons costimulé des cellules A549 par TNF α +IFN β (10ng/mL;1000U/mL) ou infecté les cellules par SeV (40HAU/10⁶ cellules) pendant 1, 3, 6, 8, 12, 16 et 24 heures. Connue pour induire la phosphorylation de STAT6, la costimulation des cellules A549 avec IL4+IL13 (50ng/mL+12ng/mL) nous a servi de contrôle positif [67].

Les résultats de l'immunobuvardage (figure 3-2.3) nous indiquent qu'aucune phosphorylation de STAT6 n'est détectée dans le contexte de la costimulation par TNF α +IFN β . Ce résultat suggère que STAT6 semble être actif par d'autres mécanismes que la phosphorylation de la tyrosine 641. La partie carboxyl-terminale de STAT6 est responsable pour l'activation de la transcription de gènes. Il y a deux régions distinctes situées à l'extrémité C-terminale de STAT6 permettant sa transactivation. La sérine 756 retrouvée à l'extrémité C-terminale est phosphorylés suite à la stimulation par IL-4. Toutefois, le rôle fonctionnel de cette modification n'a pas été déterminé [70]. Il serait donc intéressant de se demander si STAT6 peut être activé par phosphorylation à d'autres sites, indépendamment de la phosphorylation sur la tyrosine 641. Par contre, nous observons que l'expression de STAT6 total est induite à partir de 8 heures post-costimulation par TNF α +IFN β . Dans le contexte d'une infection par SeV, une phosphorylation de STAT6 est détectable à partir de 16 heures post-infection et est augmentée à 24 heures. Nous constatons également que STAT6 total est

induit à 16 et 24 heures post-infection. L'immunobuvardage de STAT6 total révèle deux bandes, une à 95 kDa et une seconde à 105 kDa. De plus, nous retrouvons trois formes de STAT6 phosphorylé (II, III et IV), la forme II a un poids moléculaire de 95 kDa, la forme III a un poids moléculaire de 97 kDa et la forme IV est à un poids moléculaires plus élevé, soit de 115 kDa. STAT6 est connu pour être phosphorylé à la tyrosine 641, mais également sur la sérines 407 et la thréonine 572 [65]. Nous pourrions penser que les différentes formes de phosphorylation causant ainsi une variation dans les poids moléculaires de STAT6. Une autre hypothèse serait que STAT6 soit dégradé ce qui expliquerait la visualisation de différents poids moléculaires. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions utiliser des ARN interférant contre STAT6 et par immunoblot, nous pourrions valider si STAT6 est présent dans ces conditions.

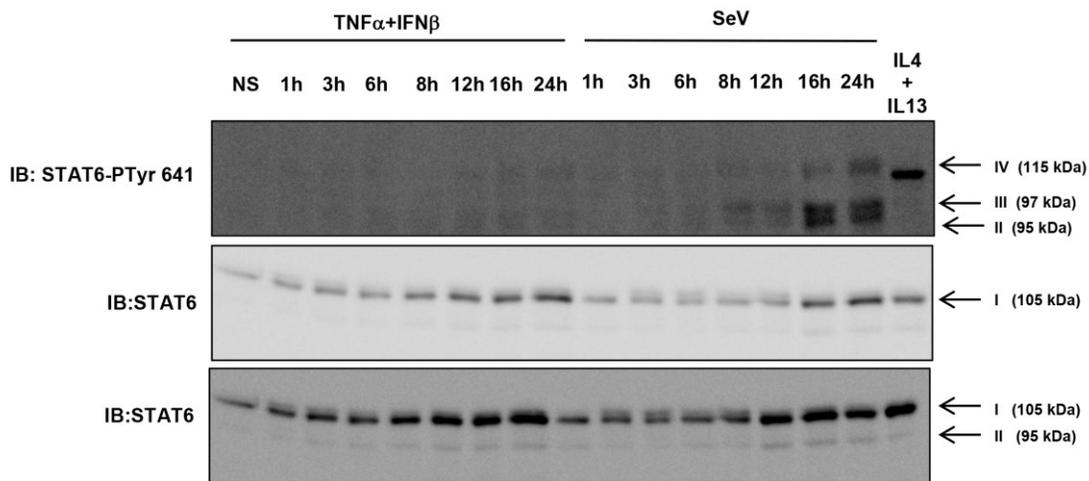


Figure 3-2.3: Cinétique de la phosphorylation de STAT6 suite à la costimulation avec du TNF α +IFN β ou à la suite d'une infection par SeV

Des cellules A549 ont été stimulées ou non (NS) avec du TNF α +IFN β (10ng/mL;1000U/mL) ou infectées par SeV (40 HAU/10⁶ cellules) pendant les temps indiqués. La costimulation pour l'IL4+IL13 (50ng/mL;12ng/mL) a été utilisée comme contrôle positif de la phosphorylation de STAT6. Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE et l'expression des protéines de STAT6-P-Tyr641 et STAT6 ont été analysés par immunoblot (IB). Données préliminaires.

Chapitre 4: Discussion

C'est grâce à une communication adéquate entre les cellules des différentes composantes du système immunitaire qu'une protection efficace contre les pathogènes est développée. Cette communication est orchestrée par les cytokines et chimiokines qui servent de messenger en agissant de manière autocrine/paracrine [71]. Depuis près d'un demi-siècle, les fonctions biologiques et les mécanismes de signalisation induits par une grande variété de cytokines ont été étudiés et caractérisés. Cependant, ces études ont été principalement réalisées *ex vivo* selon un mode de stimulation par une seule cytokine, une situation qui se produit rarement dans des conditions physiologiques. Une cellule est plutôt soumise simultanément à plusieurs cytokines dont la synergie peut induire une réponse qui diffère de celle enclenchée par la stimulation individuelle de chacune des cytokines.

Il est bien documenté que lors d'une infection par un virus respiratoire, les premières cibles sont les cellules épithéliales des voies aériennes qui répondent rapidement, en grande partie via la sécrétion de cytokines et chimiokines. Parmi ces cytokines, la sécrétion d'IFN β induit un état antiviral dans les cellules infectées et les cellules avoisinantes principalement via l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT conduisant à la formation du complexe ISGF3, formé de STAT1, STAT2 et IRF9. Le complexe transcriptionnel ISGF3 contrôle l'expression de centaines de gènes ISG qui codent pour des protéines à activité antivirale [35, 72]. Une caractéristique importante reliée à cette réponse antivirale médiée par les IFN de type I est qu'elle est activée dans les minutes qui suivent l'infection afin d'inhiber précocement la réplication virale [72].

Des études récentes ont permis de montrer que le TNF α , également sécrété lors d'une infection virale, entre en action par synergie avec l'IFN β pour induire l'expression tardive d'un panel de gènes qui sont peu ou pas induit par l'une ou l'autre de ces cytokines lorsqu'elles sont utilisées séparément [45]. Une étude récente du laboratoire du Dr. Nathalie Grandvaux a démontré que le gène *DUOX2* répond à l'action synergique entre TNF α +IFN β dans les cellules épithéliales aériennes [44]. Cette étude a également permis de démontrer que la régulation de *DUOX2* implique les protéines STAT2 et IRF9, mais est indépendante de

STAT1 (figure 4-1) [44]. Les mécanismes expliquant l'expression tardive des gènes induits de manière synergique en réponse à $TNF\alpha+IFN\beta$ sont encore inconnus.

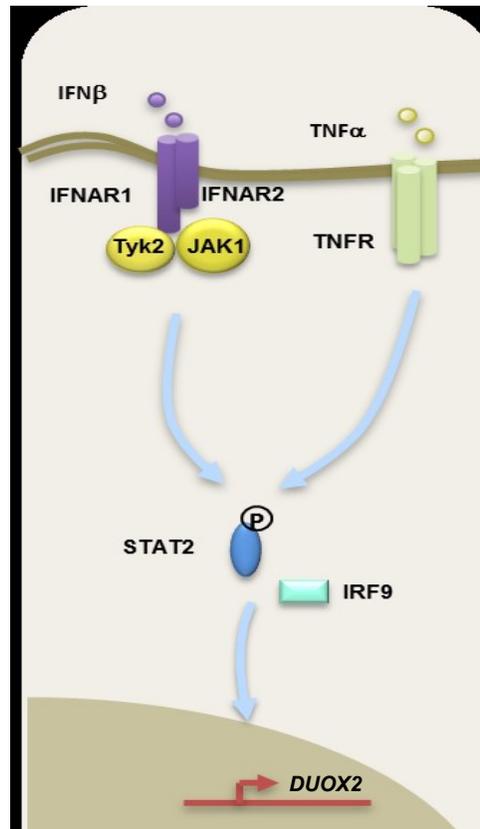


Figure 4-1: Régulation de l'expression de *DUOX2* en réponse à $TNF\alpha+IFN\beta$

Voie de signalisation induite par l'action synergique du $TNF\alpha+IFN\beta$, impliquant la phosphorylation de $STAT2$ par $Tyk2$ et l'induction de $IRF9$ qui vont transloquer au noyau pour permettre l'expression tardive de *DUOX2*.

Nos études visaient à déterminer l'importance de cette nouvelle voie de signalisation induite en réponse à la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$ impliquant STAT2 et IRF9, indépendamment de STAT1 dans l'induction de gènes antiviraux et immunorégulateurs. Nos résultats suggèrent que cette nouvelle voie de signalisation n'est pas limitée à la régulation de *DUOX2*, mais contrôle également les gènes *APOBEC3G* et *CXCL10* qui sont induits dans les cellules épithéliales pulmonaires en réponse à l'action synergique entre $TNF\alpha+IFN\beta$. L'étude de ces gènes dans les cellules U3A qui n'expriment pas STAT1 a permis de démontrer que leur expression est régulé de manière transcriptionnelle et est également dépendante de STAT2 et IRF9.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une protéine pourrait remplacer la fonction de STAT1 dans la voie de signalisation dépendante de STAT2 et IRF9 induite en réponse à la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$. La protéine STAT6 possède plusieurs caractéristiques qui suggéraient qu'elle était une candidate potentielle. Cependant, nous avons déterminé que STAT6 agit comme un régulateur négatif de l'expression de *DUOX2* dans le contexte de la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$.

4.1.0 La voie de signalisation dépendante de STAT2/IRF9, mais indépendante de STAT1, contrôle un programme transcriptionnel antiviral et immunorégulateur induit par l'action synergique entre TNF α et IFN β

L'analyse par qRT-PCR d'un panel de gènes nous a permis d'identifier plusieurs gènes induits par TNF α +IFN β de manière synergique dans les cellules épithéliales pulmonaires. Ces gènes codent pour des protéines qui ont des activités antivirales ou immunorégulatrices bien caractérisées:

- NOD2, également connu pour être induit par le TNF α et l'IFN γ [73], est un récepteur qui reconnaît des composants bactériens pour activer l'immunité innée [74].
- *APOBEC3G*, une protéine antivirale exprimée en réponse aux IFN [75] permet d'inhiber la réplication de certains virus par désamination de la cytosine [76, 77].
- DUOX2, est une NADPH oxydase qui permet la production de peroxyde d'hydrogène extracellulaire. *DUOX2* est induit par plusieurs types de cytokines et de IL [78] lors d'une stimulation unique *in vitro*, par contre son induction par la costimulation n'avait pas été découverte, jusqu'à tout récemment.
- IRF1, un facteur de transcription de la famille des IRF qui a des fonctions immunomodulatrices via la régulation de multiples gènes impliqués dans la réponse antivirale, la réponse proinflammatoire et le développement du système immunitaire. IRF1 est connu pour être induit par la costimulation du TNF α +IFN γ ou par l'IFN β [36, 79, 80].
- IDO, une enzyme qui module, entre autres, les cellules T en catabolisant le tryptophane [81]. Ainsi, en diminuant le tryptophane intracellulaire, la traduction de la protéine virale est inhibée [82]. IDO est connue pour être induit par l'action synergique entre TNF α +IFN γ ou par l'IFN γ seul [56].

- *CXCL10*, est une chimiokine exprimée en réponse à $\text{IFN}\gamma$ seul ou par la costimulation du $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$ [58, 83] qui permet le recrutement de cellules du système immunitaire [84], incluant les cellules NK, les macrophages, les lymphocytes T et les neutrophiles [57].

4.1.1: Mécanismes de synergie impliqués dans la régulation des gènes induits par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$

Il est bien caractérisé que l' $\text{IFN}\beta$ est une cytokine impliquée dans la régulation de l'immunité innée et adaptative sécrétée par plusieurs types cellulaires [85]. Basée sur plusieurs études, la liaison de l' $\text{IFN}\beta$ sur son récepteur IFNAR déclenche rapidement une cascade de signalisation initiée par Tyk2 et JAK1 qui phosphoryle STAT1 et STAT2. Leur phosphorylation permet leur dimérisation et s'associeront avec IRF9 pour former un complexe, nommé ISGF3 [19] (figure 1-3.0). Or, nous avons analysé si l'expression de *CXCL10*, *APOBEC3G* et *IDO*, connus pour être induits par la costimulation du $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$, étaient indépendante de la voie STAT1 dans les cellules U3A, n'exprimant pas STAT1. Nous avons exclu *DUOX2*, car son expression est restreinte aux cellules épithéliales.

Tout d'abord, puisque les expériences d'amplification de l'ARNm de *IDO* fait par qRT-PCR n'étaient pas reproductibles (résultats non montrés), les résultats concernant *IDO* n'ont pas été retenus. L'observation que *APOBEC3G* soit induit de manière significative dans les cellules U3A reste à être confirmé suite à une optimisation des paramètres de stimulation, puisque l'induction de *APOBEC3G* est faible (proche de la limite habituellement considérée comme significative ≥ 2), par contre nous remarquons une tendance que l'expression de *APOBEC3G* est indépendante de STAT1 lors de costimulation par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ (figure 3.1.2.3). *CXCL10* est induit de manière significative (figures 3-1.1 et 3-1.2.3) en réponse à $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$, c'est résultats nous a permis de démontrer que son expression ne nécessite pas la présence de STAT1, malgré le fait que plusieurs études ont affirmé que l'expression de *CXCL10* est dépendante de STAT1 [57, 61, 62]. Bien que l'induction de *APOBEC3G* soit faible, il est notable d'observer que l'inhibition de l'expression de STAT2 ou IRF9 ramène

l'expression de *APOBEC3G* égale ou inférieure à son niveau basal (figure 3-1.2.3) contrairement à l'expression de *CXCL10* qui est principalement induit en présence de STAT2 et IRF9 lors de la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$.

À la fin de ces résultats, nous obtenons qu'un seul gène, *CXCL10*, qui est significativement induit par l'action synergique entre $TNF\alpha+IFN\beta$ et qui dépend de la voie de signalisation STAT2 et IRF9. Il serait important de connaître le transcriptome des gènes qui sont également induits par cette voie de signalisation dépendante de STAT2 et IRF9 afin de déterminer la nature des gènes régulés par cette voie tardive. Nous pourrions, par ARNseq déterminer le profil des gènes induits par la costimulation du $TNF\alpha+IFN\beta$ dans les cellules U3A. De plus si nous incluons dans cette expérience des conditions de cellules U3A, également costimulées par $TNF\alpha+IFN\beta$ et transfectées par des ARNi contre STAT2 et IRF9 nous pourrions déterminer les gènes exprimés de manière dépendante de STAT2 et de IRF9 comparativement aux gènes induits par la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$ qui ne seraient pas dépendant de la voie STAT2/IRF9.

Bien que tous induits par la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$, ces gènes ont des profils différents:

- *NOD2* et *IRF1* sont induits autant par $TNF\alpha$ seul, $IFN\beta$ seul et par la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$. Fait à noter, *NOD2* et *IRF1* sont les deux seuls gènes qui sont induits de manière précoce en réponse à $TNF\alpha+IFN\beta$, c'est-à-dire dès 3 heures post-stimulation. Leur expression reste maximale jusqu'à 24 heures. Il est très probable que le $TNF\alpha+IFN\beta$ par « action coopérative » en augmentant de manière synergique le niveau d'expression de *NOD2* et de *IRF1* [42] (figure 1-2.3). Plus précisément, la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$ induit l'expression de *NOD2* et de *IRF1* à des niveaux plus élevés que le niveau d'expression observés lors d'un traitement par la stimulation du $TNF\alpha$ seul ou de l' $IFN\beta$ seul. Ainsi, nous pourrions penser que chacune des voies de signalisation induite par $TNF\alpha$ seul et par l' $IFN\beta$ seul permet d'activer des facteurs de transcription respectif et

que leur action synergique permet d'augmenter la quantité d'ARNm de NOD2 et IRF1 lorsque les cellules sont costimulées par $TNF\alpha+IFN\beta$.

- *APOBEC3G* et *DUOX2* sont induits faiblement par l' $IFN\beta$ seul et il n'y a aucune induction par la stimulation unique du $TNF\alpha$. Par contre, leur niveau d'expression augmente considérablement de manière synergique lors de la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$. Ce profil d'expression nous amène à penser que le $TNF\alpha+IFN\beta$ sont synergiques par « induction coopérative » [42] (figure 1-2.3) puisque la voie de signalisation induite par la costimulation du $TNF\alpha+IFN\beta$ permet principalement d'induire l'expression de *APOBEC3G* et *DUOX2*. Leur expression est induite par une voie de signalisation différente de la voie induite par l'une ou l'autre des cytokines suite à une stimulation unique. Il ne faut pas exclure le fait que *APOBEC3G* et *DUOX2* sont faiblement exprimés par l' $IFN\beta$ seul, ce qui peut contribuer à augmenter le niveau d'expression lors de la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$ si nous prenons pour acquis qu'il y a deux voies de signalisation qui induisent l'expression de *APOBEC3G* et *DUOX2*.

L'induction de *CXCL10* est exclusivement provoquée par la costimulation du $TNF\alpha+IFN\beta$, ce qui nous indique que le $TNF\alpha+IFN\beta$ entre en action de manière synergique par « induction coopérative » [42] (figure 1-2.3) qui active une voie de signalisation autre que celle induite par l'une ou l'autre des cytokines lors de la stimulation unique.

Un des mécanismes possible expliquant le phénomène de la synergie est donné par les travaux de l'équipe de Nathalie Grandvaux qui révèlent que le $TNF\alpha$ contribue à l'induction de IRF9 et que la synergie du $TNF\alpha+IFN\beta$ induit une activation accrue et soutenue de JAK qui médie la phosphorylation de STAT2. Ainsi, l'induction de IRF9 et la phosphorylation de STAT2 contribuent probablement à l'activation de la voie de signalisation dépendante de STAT2 et IRF9 en réponse à la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$. Ces résultats sont appuyés par des études antérieures qui indiquent que le $TNF\alpha$ médie l'activation de JAK [86].

4.1.2 L'induction synergistique des gènes antiviraux et immunorégulateurs en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β implique une régulation transcriptionnelle

L'induction tardive des gènes induits par TNF α +IFN β pose la question du mécanisme sous-jacent. En effet, jusqu'ici il n'avait pas été démontré que ces gènes étaient régulés de manière transcriptionnelle ou si des mécanismes post-transcriptionnels pouvaient expliquer leur régulation particulière. En utilisant le promoteur de *CXCL10* comme modèle de gène régulé par TNF α +IFN β , nous avons observé une induction de l'activité promotrice en réponse à la costimulation (figure 1-3.0). Ces résultats impliquent que les gènes immunorégulateurs et antiviraux induits en réponse à la costimulation par TNF α +IFN β via la voie STAT2/IRF9 sont régulés au moins en partie de façon transcriptionnelle.

Le groupe de Grant McFadden a réalisé une étude des profils de gènes induits par TNF α +IFN β dans plusieurs types cellulaires par la méthode de puces à ADN [87]. Des études bioinformatiques réalisés à partir de ces profils n'ont pas permis d'identifier les séquences consensus des promoteurs des gènes spécifiquement enrichis dans ces ensemble de gènes [87]. Par contre, dans notre étude, nous avons utilisé une approche simple basée sur l'étude du promoteur de *CXCL10* pour étudier les sites consensus de liaison de facteurs de transcription impliqués. Nos résultats démontrent que la régulation transcriptionnelle de *CXCL10* implique les régions régulatrices ISRE(3), NF κ B (1) et NF κ B (2). De plus, nos résultats indiquent que les deux sites ISRE(1) et ISRE(2) distaux du site d'initiation de la transcription et le site AP-1 ne sont pas impliqués dans la régulation de *CXCL10* puisque nous n'observons aucune diminution de l'activité luciférase lorsque ces sites sont mutés (figure 3-5.2).

Dans la littérature, il est surtout connu que IRF9 se complexe avec STAT1 et STAT2 pour former le facteur de transcription ISGF3, capable de se lier aux séquences ISRE du promoteur des gènes ISG induits par les IFN de type I et III [46]. Par contre de plus en plus d'évidences démontrent que STAT2 et IRF9 sont également capables de se lier aux séquences ISRE en l'absence de STAT1 [88]. Il est donc envisageable que STAT2/IRF9 se lient à la

région ISRE (3) du promoteur suite à la costimulation par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$. Enfin, les deux sites $\text{NF}\kappa\text{B}$ (1) et (2) sont également impliqués dans la régulation de *CXCL10*. Comme le $\text{TNF}\alpha$ est connu pour activer $\text{NF}\kappa\text{B}$, nous pourrions penser que la voie induite par la costimulation du $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ permet également d'activer $\text{NF}\kappa\text{B}$ qui ira se lier aux régions régulatrices du promoteur de *CXCL10*. Nous pourrions nous demander si la transcription des gènes induits par la voie de signalisation dépendante de STAT2/IRF9 , indépendamment de STAT1 en réponse au $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ est également régulée de manière transcriptionnelle par STAT2/IRF9 et des sous-unités de $\text{NF}\kappa\text{B}$. Afin de vérifier la liaison directe de STAT2/IRF9 et des sous-unités de $\text{NF}\kappa\text{B}$ sur les promoteurs des gènes régulés par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$, nous pourrions utiliser la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Il serait également intéressant de se demander pourquoi, contrairement à une stimulation par $\text{IFN}\beta$ seul, la synergie par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ n'implique pas STAT1 dans la voie de signalisation dépendante de STAT2/IRF9 .

Les mécanismes expliquant comment à un certain moment l'environnement cellulaire discriminant STAT1 pour favoriser la voie STAT2 et IRF9 en réponse à la costimulation par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ sont très peu connus. Par contre, une étude intéressante a démontré que dans les cellules Hela stimulées par $\text{TNF}\alpha$, STAT1 se retrouve associé au récepteur TNFR1 et les facteurs de signalisation TRADD et FADD [89]. Ainsi, c'est une hypothèse intéressante de penser que dans le contexte de la costimulation par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$, le $\text{TNF}\alpha$ induit la séquestration de STAT1 par son interaction avec TNFR1 . Ceci favoriserait un environnement où STAT2 serait en plus grande quantité dans la cellule favorisant ainsi son interaction avec d'autres partenaires que STAT1 .

4.1.3: Mécanismes possibles de l'induction tardive des gènes en réponse à $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$

Il est notable que l'expression de *DUOX2*, *CXCL10* et de *APOBEC3G* se fait tardivement, c'est-à-dire à partir de 9 heures suivant la costimulation par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$. Contrairement aux ISG induits par les IFN de type I via la voie classique médiée par ISGF3

qui sont induits après quelques minutes [90, 91]. Bien que les mécanismes impliqués n'aient pas encore été identifiés, il est possible d'émettre plusieurs hypothèses.

Une première possibilité qui aurait pu être envisagée est que la stimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$ utilise des récepteurs différents de ceux utilisés lors de l'activation par les $IFN\beta$ et $TNF\alpha$ seuls. Cette hypothèse a pu être écartée. En effet, notre laboratoire a démontré que l'inhibition de l'expression du récepteur TNFR1 ou de la sous-unité IFNAR1 par des ARNi spécifiques diminue l'induction de *DUOX2* en réponse à $TNF\alpha+IFN\beta$. Ceci suggère que la voie de signalisation dépendante de STAT2/IRF9 et indépendante de STAT1 est médiée par les récepteurs de TNFR1 et IFNAR [86].

Une deuxième hypothèse serait que le temps que la synthèse *de novo* d'une protéine autre que STAT2 et IRF9 est nécessaire pour l'expression des gènes. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions costimuler les cellules U3A par $TNF\alpha+IFN\beta$ en présence de cycloheximide afin de bloquer la traduction et vérifier si l'expression des gènes induits par la costimulation du $TNF\alpha+IFN\beta$, mesurée par qRT-PCR, est inhibée. Cependant, cette approche présente un défi pour l'interprétation. En effet, par cette méthode l'induction de STAT2 et IRF9 observée en réponse à $TNF\alpha+IFN\beta$ serait également inhibée et introduirait un biais dans l'interprétation des résultats. Une seule alternative serait d'identifier la protéine en question. Deux avenues peuvent être envisagées: premièrement, réaliser un crible de ARNi pour trouver d'autres régulateurs ; deuxièmement, identifier les partenaires d'interaction de STAT2 et IRF9 dans l'hypothèse où cette protéine formerait un complexe avec STAT2 et/ou IRF9.

4.1.4: Mécanismes antiviraux indépendants de STAT1.

De plus en plus d'évidences démontrent qu'il existe des mécanismes antiviraux qui sont indépendant de STAT1. Le groupe de Iain L. Campbell a étudié les rôles de STAT1, STAT2 et IRF9 dans la réponse virale suite à une infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Ils ont infecté des souris de type sauvage, des souris déficientes en STAT1, STAT2 ou IRF9. Ils ont remarqué que les souris de type sauvage qui ont été infecté

ont survécu à l'infection et qu'elles sont parvenues à éliminer le virus. Les souris dépourvues de STAT2 et IRF9 ont également survécu, par contre il y a eu une persistance à l'infection virale. Toutefois, dans le cas des souris dépourvues de STAT1 l'infection par LCMV a été létale. Ils ont retrouvé chez ce groupe de souris une grave pathologie immunitaire avec une expression élevée de diverses cytokines dans les tissus et le sérum. Cette étude a mis en évidence le rôle fondamentale de STAT1 qui permet d'empêcher l'émergence du virus comparativement à la fonction de STAT2 et de IRF9 qui permet de soutenir la réponse antivirale [92]. Ainsi, STAT1 est requis pour une réponse antivirale beaucoup plus puissante que celle engendrée par STAT2. Cette conclusion corrobore bien avec nos données puisque le fait que la voie de signalisation impliquant STAT2 permet d'induire un état antiviral plus soutenu permet de comprendre l'expression tardive des gènes induits par la costimulation du $TNF\alpha$ +IFN comparativement aux gènes exprimés en réponse à l'IFN β .

Une autre étude a utilisé des souris dépourvues de STAT1, STAT2 ou STAT1+STAT2 infectées par DENV pour étudier l'importance de STAT1 et de STAT2 dans la réponse antivirale. Les souris dépourvues de STAT1 ou STAT2 présentaient de 50 à 100 fois un niveau plus élevé d'ARN viral. Par contre, l'infection des souris dépourvues de STAT1+STAT2 par DENV a entraîné la mort précoce suite à l'infection. Ils expliquent que cette mortalité est due à la perte de la voie de signalisation induite par les IFN de type I et II. À l'inverse, STAT1 ou STAT2 seul permet de compenser suffisamment les mécanismes manquant par l'absence soit de STAT1 ou de STAT2 permettant une protection contre l'infection par DENV [93]. Ceci nous démontre que dans d'autres contextes, lors d'une infection virale, l'absence de STAT1 n'est pas létal et que la voie de signalisation impliquant STAT2 est suffisante pour assurer une protection antivirale.

La capacité de STAT2 et de IRF9 à induire l'activation des gènes a très peu été étudié. Par contre, des preuves importantes de la régulation de gènes par STAT2 et IRF9, indépendamment de STAT1, ont été publiées. Ainsi, le groupe de Jian-Hua Tong a démontré lors de la stimulation des cellules U3A par l'IFN α , que STAT2 forme un complexe avec IRF9 et se lie aux régions ISRE du promoteur de RIG-G permettant son expression. Ces résultats

indiquent l'existence d'une voie alternative, indépendante de STAT1, capable de moduler les ISG, dépendante de STAT2 et de IRF9 permettant la transcription de RIG-I. Ils ont également démontré que la phosphorylation de STAT2 n'est pas nécessaire pour l'induction de RIG-G [94]. D'autres études ont également soutenu que la phosphorylation de STAT2 dans les cellules U3A induite par la stimulation par IFN α permet la formation d'homodimères stables capables d'interagir avec IRF9 qui sont recrutés à l'ADN aux régions ISRE pour permettre l'expression des gènes [95, 96]. Le groupe de Hans A.R. Bluysen a également démontré que STAT2 interagit avec IRF9 suite à la stimulation par l'IFN α dans les cellules U3A dans lesquelles STAT2 a été surexprimé (U3C). L'homodimère STAT2/IRF9 se lie aux régions ISRE et permet la transcription de gènes ISG. Ils proposent que le complexe STAT2/IRF9 peut remplacer le rôle de ISGF3 dans la voie de signalisation indépendamment de STAT1 induite par l'IFN α [97, 98]. L'ensemble de ces données sont en accord avec les résultats que nous avons obtenus dans notre étude et soutiennent que STAT2 et/ou IRF9 sont capables de réguler une réponse antivirale et immunorégulatrice en l'absence de STAT1.

4.2.0 STAT6, un régulateur négatif de *DUOX2* dans la voie de signalisation induite en réponse au TNF α +IFN β

La costimulation des cellules A549 par TNF α +IFN β permettant d'activer une voie de signalisation dépendante de l'activation de STAT2 et de l'induction d'IRF9, indépendamment de STAT1, il est possible qu'une autre protéine puisse remplacer la fonction de STAT1. Plusieurs publications ont présenté des travaux démontrant que STAT6, dans d'autres contextes que la costimulation par TNF α +IFN β , possède plusieurs caractéristiques qui nous permettraient d'émettre l'hypothèse que STAT6 pouvait être impliqué dans cette voie de signalisation dépendante de STAT2 et IRF9. L'équipe de Xavier De Deken a présenté des travaux démontrant que STAT6, dans les cellules thyroïdiennes et les cellules épithéliales intestinales, est activé par JAK1 lors d'une stimulation par IL4+IL13 et induit l'expression de *DUOX2* [67]. Or, la voie de signalisation induite par le TNF α +IFN β permet l'expression tardive de *DUOX2* dans les cellules épithéliales pulmonaires [44]. De plus, il a également été

démontré que STAT6 peut se complexer avec STAT2 et IRF9 lorsque les lymphocytes B sont stimulés par $\text{INF}\alpha$ [40]. Nous pourrions donc penser que STAT6 interagit avec le complexe STAT2/IRF9 de la voie de signalisation induite par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$. De plus, selon l'article de Huihui Chen, STAT6 joue un rôle dans l'immunité innée suite à une infection virale par SeV indépendamment des JAK. Ils ont démontré que lors de l'infection par SeV de cellules U4A, une lignée de fibroblastes où l'expression de JAK1 est inhibée, la protéine adaptatrice STING permet le recrutement de TBK1 qui phosphoryle la Sérine 407 de STAT6 et permettre l'activation d'une autre kinase qui va phosphoryler la Tyrosine 641 de STAT6 permettant ainsi son homodimérisation et sa translocation au noyau. Cette activation non classique de STAT6 permet la transcription de gènes ISG spécifiques et de chimiokines afin de recruter les cellules immunitaires [65]. Nous avons ainsi pensé que SeV pourrait également induire l'activation de STAT6 dans les cellules pulmonaires.

STAT6 a surtout été identifié en tant qu'inducteur de l'expression des gènes, mais contrairement à son rôle de régulateur positif de l'expression génique, nos données suggèrent que STAT6 lors de la costimulation par $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ régulerait négativement l'expression de *DUOX2*. Bien que STAT6 ait initialement été identifié comme un régulateur positif de la transcription des gènes, les travaux récents de l'équipe du Dr. Paul B. Rothman ont démontré que STAT6 peut avoir deux fonctions, soit être un régulateur négatif ou être un régulateur positif de l'expression génique. Ils ont comparé le profil d'expression des gènes d'un groupe de lymphocytes B $\text{STAT6}^{+/+}$ avec un groupe de lymphocytes B $\text{STAT6}^{-/-}$ induits par la stimulation de l'IL-4. Les analyses ont démontré que sur un ensemble de 106 gènes, 31 gènes étaient exprimés en plus grande quantité et 39 gènes étaient exprimés à des niveaux plus faibles dans les lymphocytes B où STAT6 est présent comparé aux lymphocytes B déficients en STAT6. Cette expression différentielle démontre que STAT6 possède à la fois des fonctions régulatrices positives et négatives lorsqu'il est activé par l'IL-4. Ils ont soutenu que STAT6 interfère avec l'activité de $\text{NF}\kappa\text{B}$ par compétition en se liant aux éléments de liaison de $\text{NF}\kappa\text{B}$ à l'ADN. Un autre mécanisme possible est que STAT6 médierait l'induction de la transcription de répresseurs. [99]. Ce changement de fonction pourrait s'expliquer par le fait que STAT6 a été décrit pour être un antagoniste du facteur de transcription $\text{NF}\kappa\text{B}$. STAT6

peut se lier à une séquence d'ADN qui chevauche la séquence de liaison à NFκB ce qui réprime l'expression de certains gènes [100]. De plus, les différents profils d'expression des protéines kinases/phosphatases ou autres protéines régulatrices peuvent influencer la fonction régulatrice de STAT6 [99]. Le fait que STAT6 régule négativement l'expression de DUOX2 semble éliminer la possibilité qu'il agisse au sein d'un complexe avec STAT2 et IRF9 qui agit comme régulateur positif. Il est donc plus vraisemblable que STAT6 agisse parallèlement à la voie STAT2/IRF9.

Nous avons détecté différents poids moléculaires grâce à un anticorps dirigé vers STAT6 (figure 3.2.3) lors de la lyse des cellules épithéliales pulmonaires. Cette variabilité peut être causée par la méthode d'extraction des protéines qui engendrerait une dégradation des protéines. En effet, la lyse cellulaire a été effectuée par sonication et à l'aide d'un tampon de lyse NP-40. Les études du groupe de Shelburne ont démontré que le tampon de lyse contenant les inhibiteurs de protéase standard au cours de la préparation des échantillons peut occasionner une protéolyse de STAT6 et créer une variabilité dans les poids moléculaires observés dû à la dégradation [101]. Afin de remédier à cette éventualité nous pourrions ajouter davantage d'inhibiteurs de protéase dans le tampon de lyse. Nonobstant la probabilité de cette possibilité, nous envisageons aussi l'éventualité que cette variabilité dans les poids moléculaires puisse être due à la présence ou l'absence de phosphorylations aux divers sites présents sur STAT6.

Il serait important d'étudier si STAT6, lors de la costimulation par TNFα+IFNβ est également un régulateur négatif de l'ensemble des gènes antiviraux et immunorégulateurs induits ou s'il est dans certains cas un régulateur positif. Un effet différentiel pourrait être envisagé en fonction de la présence d'un site NFκB ou non à proximité du site de liaison de STAT6. Afin de répondre à cette question, nous pourrions comparer par ARNseq l'expression des gènes antiviraux et immunorégulateurs dans un groupe de cellules pulmonaires costimulé par TNFα+IFNβ où l'expression de STAT6 est inhibée, par exemple par ARNi, à un groupe de cellules costimulé où l'expression de STAT6 est fonctionnelle. Ceci nous permettrait de connaître si ces gènes sont régulés négativement ou positivement par STAT6. Par la suite,

nous pourrions costimuler des cellules A549 par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ puis nous pourrions isoler les différents complexes contenant STAT6 par chromatographie par exclusion de taille et purifier par une IP de STAT6 différents complexes pour ensuite les identifier par le séquençage de deuxième génération. Ceci nous permettrait d'identifier les protéines coactivatrices ou corépressives recrutées par STAT6 qui pourraient être impliqués dans ce changement de fonction.

Dans la littérature, STAT6 est activé suite à une phosphorylation de la tyrosine 641 qui lui permet de dimériser avec une autre protéine STAT [102, 103]. Un exemple concret est que la stimulation par IL-4+IL-13 permet d'induire la phosphorylation de STAT6 à la tyrosine 641 par JAK, ce qui permet à STAT6 son homodimère par son domaine SH2 [104]. Afin de mieux caractériser l'activité de STAT6 lors de la costimulation par $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ et lors d'une infection par SeV, nous avons étudié la cinétique de la phosphorylation sur la tyrosine 641 de STAT6. Les résultats préliminaires de la figure 3-9 nous indiquent que la costimulation des A549 par le $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$ n'induit pas la phosphorylation de STAT6. Il est connu que les STAT sont également phosphorylés sur des sérines 662 [105, 106], il serait donc intéressant de regarder à ce niveau si seule la phosphorylation d'une sérine sur la protéine STAT6 est suffisante pour sa régulation en tant que régulateur négatif. Une autre avenue possible est que STAT6 n'aurait pas besoin de phosphorylation pour son rôle de régulateur négatif puisque STAT6 non phosphorylée est capable de s'associer avec p300 et peut directement lier un site consensus du promoteur de la cyclooxygénase-2 (COX-2) ce qui contribue à l'expression constitutive de COX-2 dans les cellules pulmonaires cancéreuses [107]. Ces concepts pourraient également être applicables pour STAT6 lors de la costimulation par le $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\beta$. Par contre, dans le contexte d'une infection par SeV, nos résultats démontrent la phosphorylation de STAT6 à la tyrosine 641 à 8 heures post-infection et qui augmente à 16 et 24 heures, ce qui corrobore avec l'activation de STAT6 par la phosphorylation de la tyrosine 641, déjà documentée dans la littérature [66, 70, 105].

Chapitre 5: Conclusion et perspectives

Notre étude a permis de démontrer qu'il existe une voie alternative induite synergiquement par $TNF\alpha+IFN\beta$ qui est dépendante de STAT2 et IRF9 sans la contribution de STAT1, contrairement à la voie classique induite par $IFN\beta$ seul déjà bien caractérisée qui est médiée par le complexe ISGF3 (STAT1/STAT2/IRF9). Cette nouvelle voie contrôle l'expression tardive de gènes immunorégulateurs et antiviraux incluant *DUOX2*, *APOBEC3G* et *CXCL10*, tout induits par l'action synergique entre $TNF\alpha+IFN\beta$ dans les cellules épithéliales des voies respiratoires. Finalement, plusieurs caractéristiques nous amenaient à penser que STAT6 était impliqué dans la voie de signalisation dépendante de STAT2/IRF9, indépendamment de STAT1. Nos données suggèrent que STAT6 serait un régulateur négatif dans l'expression de *DUOX2* autant lors de la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$ que lors d'une infection par SeV. Par contre dans le contexte de la costimulation, l'activation de STAT6 ne se fait pas par la phosphorylation de la tyrosine 641 comparativement à son activation induite par SeV. Il est tentant de penser qu'un partenaire spécifique pourrait remplacer STAT1 dans un nouveau complexe STAT2/IRF9 induit par $TNF\alpha+IFN\beta$. Il serait donc intéressant d'identifier les partenaires d'interaction de STAT2 et IRF9 par une approche protéomique. Le rôle des nouveaux partenaires sera déterminé par la technique des ARNi dans le contexte de la régulation des gènes induits en réponse à la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$.

Afin d'approfondir l'étude des régions régulatrices de STAT2 et de IRF9 au promoteur de *CXCL10*, nous pourrions utiliser la technique de ChIP puisque nous avons déterminé les régions promotrices sensibles à la costimulation par $TNF\alpha+IFN\beta$. Il serait également important de déterminer, par la technique d'ARNseq le profil des gènes induits par la voie de signalisation dépendante de STAT2/IRF9, indépendamment de STAT1 en réponse à l'action synergique entre $TNF\alpha+IFN\beta$. Nous pourrions utiliser les U3A transfectées avec des ARNi contrôle, ou dirigés contre STAT2 ou IRF9 et stimulées par $TNF\alpha+IFN\beta$. Une analyse différentielle des gènes régulés par STAT2 et/ou IRF9 permettrait d'avoir une image globale de l'implication de cette régulation tardive dans le contrôle d'une réponse antivirale et immunorégulatrice lors d'une infection virale. Finalement, si les résultats confirment que STAT6 est bien impliqué dans la voie de signalisation induite par la costimulation du $TNF\alpha+IFN\beta$, il serait intéressant d'évaluer s'il se complexe avec des protéines en faisant une

coimmunoprécipitation de STAT6. De plus, nous pourrions déterminer par l'utilisation d'ARNi ciblés contre STAT6, si les gènes trouvés pour répondre à la costimulation du $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ sont tous régulés de la même manière par STAT6.

En conclusion nos résultats permettent de comprendre de manière plus détaillée les mécanismes de la défense de l'hôte lors d'une infection virale. La caractérisation encore plus détaillée de cette voie de signalisation induite par la costimulation du $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\beta$ permettrait de savoir si cette voie de signalisation est complémentaire à la voie de signalisation induite par les IFN. Nous pourrions penser qu'elle aurait pour fonction de soutenir la réponse antivirale afin d'offrir un mécanisme de défense plus efficace. Ainsi, dans le cas d'une inflammation chronique qui peut causer par exemple une obstruction des voies respiratoires ou autres conséquences de cette pathologie, il serait intéressant de considérer l'élaboration d'un médicament qui ciblerait spécifiquement une protéine impliquée dans la voie de signalisation induite par la costimulation, mais qui ne se retrouve pas dans la voie de signalisation induite par les IFN. Ceci diminuerait considérablement les effets secondaires causés par des médicaments actuels comme des inhibiteurs de TNF, des IFN ou de Jak qui sont impliqués dans des voies de signalisations importantes pour le bon fonctionnement de l'organisme. Notons que le rôle des IFN de type I et du $\text{TNF}\alpha$ ne se limite pas seulement à la réponse antivirale. En effet, une anomalie de l'expression des IFN de type I et du $\text{TNF}\alpha$ est également responsable de différentes pathologies pour l'homme. Prenons l'exemple du psoriasis, une maladie autoimmune très fréquente. Cette maladie est caractérisée par une plaque érythématosquameuse causant une inflammation dermique et épidermique qui est responsable d'une augmentation de la prolifération des kératinocytes. Il y a trois types de cellules immunitaires connus qui participent à la lésion de psoriasis : les CPA, les lymphocytes T et les kératinocytes. Ces cellules immunitaires provoquent une inflammation cutanée due à l'activation des lymphocytes T par les CPA et par le recrutement des composantes inflammatoires, comme une augmentation du $\text{TNF}\alpha$. Un des traitements actuels administré aux patients ayant la forme modérées à sévères du psoriasis est nommé Infliximab, qui est un anti- $\text{TNF}\alpha$. Ce médicament neutralise le $\text{TNF}\alpha$ soluble [108, 109]. Plusieurs voies de signalisation sont dépendantes du $\text{TNF}\alpha$, c'est pourquoi une diminution du $\text{TNF}\alpha$ dans

l'organisme peut perturber l'homéostasie de la signalisation cellulaire et créer des effets secondaires considérables. Il est donc extrêmement intéressant de comprendre ces mécanismes, encore méconnus, qui sous-tendent la synergie entre deux cytokines au niveau de la transduction du signal afin de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, l'étude de la combinaison du $TNF\alpha$ et de l' $IFN\beta$ étudiée dans ce projet peut être considérée comme modèle de concept afin de mettre en évidence un tout nouveau paradigme des mécanismes de transduction du signal qui pourrait être applicable à d'autres combinaisons de cytokines.

Bibliographie

1. Murphy Kenneth PT and MW: **Innate Immunity : The First Lines of Defense.** *Janeway's Immunobiol* 2011:37–73.
2. Netea MG, Latz E, Kingston HG, Mills LA, Neill JO': **Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense.** *Nat Immunol* 2015, **16**:675–679.
3. Akira S: **Errata to “Pathogen recognition by innate immunity and its signaling.”** *Proc Japan Acad Ser B* 2009, **85**:216.
4. Moticka EJ: *Innate Host Defense Mechanisms and Adaptive Immune Responses.* Elsevier; 2016.
5. Raven, Peter H., Peter H. Raven and PHR: *Biologie.* 2e edition. Bruxelles: De Boeck; 2011.
6. Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R: **The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors.** *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2012, **2**:103–11.
7. Mogensen TH: **Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses.** *Clin Microbiol Rev* 2009, **22**:240–273.
8. Janeway CA, Medzhitov R: **Innate Immune Recognition.** *Annu Rev Immunol* 2002, **20**:197–216.
9. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M et al.: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th Edition.* Garland Sc. New York; 2001.
10. Paul WE: **Bridging innate and adaptive immunity.** *Cell* 2011, **147**:1212–1215.
11. den Haan JMM, Arens R, van Zelm MC: **The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells.** *Immunol Lett* 2014, **162**:103–112.
12. Elgert KD: *Immunology: Understanding The Immune System.* 2e edition. New Jersey: Hoboken: Wiley-Blackwell; 2009.
13. Thompson AB, Robbins RA, Romberger DJ, Sisson JH, Spurzem JR, Teschler H, Rennard SI: **Immunological functions of the pulmonary epithelium.** *Eur Respir J* 1995, **8**:127–149.
14. Kolli D, Velayutham TS, Casola A: **Host-Viral Interactions: Role of Pattern Recognition Receptors (PRRs) in Human Pneumovirus Infections.** *Pathogens* 2013, **2**:232–263.
15. Soucy-Faulkner A, Mukawera E, Fink K, Martel A, Jouan L, Nzengue Y, Lamarre D,

- Vande Velde C, Grandvaux N: **Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression.** *PLoS Pathog* 2010, **6**:e1000930.
16. Romani L, Romani L: **Innate and adaptive immunity in.** *J Leukoc Biol* 2000, **68**(August):175–179.
17. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N: **The airway epithelium: Soldier in the fight against respiratory viruses.** *Clin Microbiol Rev* 2011, **24**:210–229.
18. Levy DE, Marié IJ, Durbin JE: **Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection.** *Curr Opin Virol* 2011, **1**:476–86.
19. Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T: **Regulation of the type I IFN induction: A current view.** *Int Immunol* 2005, **17**:1367–1378.
20. De Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ: **Type I interferon receptors: Biochemistry and biological functions.** *J Biol Chem* 2007, **282**:20053–20057.
21. Plataniias LC, Fish EN: **Signaling pathways activated by interferons.** *Exp Hematol* 1999, **27**:1583–1592.
22. Benedict CA: **Viruses and the TNF-related cytokines, an evolving battle.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2003, **14**:349–357.
23. Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM: **Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction.** *Immunity* 2004, **21**:461–5.
24. Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, Saitoh T, Kaku M, Sasaki T: **Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2.** *J Virol* 2002, **76**:5395–403.
25. Kramer B, Wiegmann K, Kronke M: **Regulation of the human TNF promoter by the transcription factor Ets.** *Journal of Biological Chemistry* 1995:6577–6583.
26. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: **Tumor necrosis factor signaling.** *Cell Death Differ* 2003, **10**(1350-9047 (Print)):45–65.
27. Davis RJ: **Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.** *Cell* 2000, **103**:239–252.
28. Delgo GM, Vignali DAA: **STAT heterodimers in immunity A mixed message or a unique signal ?** 2013, **17**(March):1–7.
29. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA: **The JAK/STAT signaling pathway.** *J Cell Sci*

2004, **117**:1281–1283.

30. Wang Y, Levy DE: **Comparative evolutionary genomics of the STAT family of transcription factors.** *Landes Biosci* 2012(March):23–33.

31. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Biologie Moléculaire de La Cellule.* Médecine-S. New York; 2007.

32. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW: **Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges.** *Gene* 2002, **285**:1–24.

33. Matsumiya T, Prescott SM, Stafforini DM: **IFN- Mediates TNF- -Induced STAT1 Phosphorylation and Induction of Retinoic Acid-Inducible Gene-I in Human Cervical Cancer Cells.** *J Immunol* 2007, **179**:4542–4549.

34. McFadden G, Mohamed MR, Rahman MM, Bartee E: **Cytokine determinants of viral tropism.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**:645–655.

35. Schoggins JW, Rice CM: **Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions.** *Curr Opin Virol* 2011, **1**:519–525.

36. de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR: **Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays.** *J Leukoc Biol* 2001, **69**:912–920.

37. Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Snider HM, Beatty PR, Harris E: **Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice.** *J Immunol* 2005, **175**:3946–3954.

38. Gil MP, Bohn E, O’Guin AK, Ramana C V, Levine B, Stark GR, Virgin HW, Schreiber RD: **Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:6680–5.

39. Ramana C V, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR: **Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling.** *Trends Immunol* 2002, **23**:96–101.

40. Fink K, Grandvaux N: **STAT2 and IRF9: Beyond ISGF3.** *Jak-Stat* 2013, **2**:e27521.

41. Trosset J-Y, Carbonell P: **Synergistic Synthetic Biology: Units in Concert.** *Front Bioeng Biotechnol* 2013, **1**(October):1–11.

42. Bartee E, McFadden G: **Cytokine synergy: An underappreciated contributor to innate anti-viral immunity.** *Cytokine* 2013, **63**:237–240.

43. Bartee E, Mohamed MR, McFadden G: **Tumor necrosis factor and interferon:**

cytokines in harmony. *Curr Opin Microbiol* 2008, **11**:378–83.

44. Fink K, Martin L, Mukawera E, Chartier S, De Deken X, Brochiero E, Miot F, Grandvaux N: **IFN β /TNF α synergism induces a non-canonical STAT2/IRF9-dependent pathway triggering a novel DUOX2 NADPH oxidase-mediated airway antiviral response.** *Cell Res* 2013, **23**:673–90.

45. Bartee E, Mohamed MR, Lopez MC, Baker H V, McFadden G: **The addition of tumor necrosis factor plus beta interferon induces a novel synergistic antiviral state against poxviruses in primary human fibroblasts.** *J Virol* 2009, **83**:498–511.

46. Au-Yeung N, Mandhana R, Horvath CM: **Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway.** *Jak-Stat* 2013, **2**:e23931.

47. Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB, Williams NS: **Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference.** *Oncogene* 2003, **22**:2054–2064.

48. Bio-Rad Laboratories: **Bio-Rad protein assay.** *Bio-rad* 2010:1–24.

49. Walker JM: **The Bradford Method for Protein Quantitation.** *PROTEIN Protoc Handb* 2002:Chapter 4.

50. Technologies A: **Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies.** 2009(January).

51. Aldai N, Hervás G, Belenguer A, Frutos P, Mantecón AR, Kramer JKG, Assays ARPCR, Baranova NS, Nilebäck E, Haller FM, Briggs DC, Svedhem S, Day AJ, Richter RP, Biosystems A, Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Folgiero V, Natale D, De Rosa L, Majolino I, Novarese L, Rocci A, Gambella M, Ciciarello M, Scambia G, Palumbo A, Locatelli F, De Cristofaro R, et al.: **Evaluating the in vitro metabolism of docosaheanoic acid in sheep rumen fluid.** *J Biol Chem* 2012, **10**:1–3.

52. **Housekeeping gene S9** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6203>]

53. McKendry R, John J, Flavell D, Müller M, Kerr IM, Stark GR: **High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both alpha and gamma interferons.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(December):11455–11459.

54. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE: **Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease.** *Cell* 1996, **84**:443–450.

55. Mestas J, Hughes CCW: **Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.** *J Immunol* 2004, **172**:2731–2738.
56. Sakash JB, Byrne GI, Lichtman A, Libby P: **Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells: implications for persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection.** *Infect Immun* 2002, **70**:3959–3961.
57. Oslund KL, Zhou X, Lee B, Zhu L, Duong T, Shih R, Baumgarth N, Hung LY, Wu R, Chen Y: **Synergistic up-regulation of CXCL10 by virus and IFN γ in human airway epithelial cells.** *PLoS One* 2014, **9**:e100978.
58. Clarke DL, Clifford RL, Jindarat S, Proud D, Pang L, Belvisi M, Knox AJ: **TNF α and IFN γ synergistically enhance transcriptional activation of CXCL10 in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF κ B, and the transcriptional coactivator CREB-binding protein.** *J Biol Chem* 2010, **285**:29101–29110.
59. Sarkis PTN, Ying S, Xu R, Yu X-F: **STAT1-Independent Cell Type-Specific Regulation of Antiviral APOBEC3G by IFN- γ .** *J Immunol* 2006, **177**:4530–4540.
60. Linderholm AL, Onitsuka J, Xu C, Chiu M, Lee W-M, Harper RW: **All-trans retinoic acid mediates DUOX2 expression and function in respiratory tract epithelium.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010, **299**:L215–L221.
61. Burke SJ, Goff MR, Lu D, Proud D, Karlstad MD, Collier JJ: **Synergistic expression of the CXCL10 gene in response to IL-1 β and IFN- γ involves NF- κ B, phosphorylation of STAT1 at Tyr701, and acetylation of histones H3 and H4.** *J Immunol* 2013, **191**:323–36.
62. Badiger R, Mitchell JA, Gashaw H, Galloway-Phillipps NA, Foser S, Tatsch F, Singer T, Hansel TT, Manigold T: **Effect of Different Interferon α 2 Preparations on IP10 and ET-1 Release from Human Lung Cells.** *PLoS One* 2012, **7**:e46779.
63. Chen H, Wang LW, Huang YQ, Gong ZJ: **Interferon- α induces high expression of APOBEC3G and STAT-1 in Vitro and in Vivo.** *Int J Mol Sci* 2010, **11**:3501–3512.
64. Spurrell JCL, Wiehler S, Zaheer RS, Sanders SP, Proud D, et al: **Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infections.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, **289**:L85–95.
65. Chen H, Sun H, You F, Sun W, Zhou X, Chen L, Yang J, Wang Y, Tang H, Guan Y, Xia W, Gu J, Ishikawa H, Gutman D, Barber G, Qin Z, Jiang Z: **Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity.** *Cell* 2011, **147**:436–46.

66. Gupta S, Jiang M, Pernis AB: **IFN-alpha activates Stat6 and leads to the formation of Stat2:Stat6 complexes in B cells.** *J Immunol* 1999, **163**:3834–41.
67. Raad H, Eskalli Z, Corvilain B, Miot F, De Deken X: **Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOXA2.** *Free Radic Biol Med* 2013, **56**:216–25.
68. Wang C, Zhu C, Wei F, Zhang L, Mo X, Feng Y, Xu J, Yuan Z, Robertson E, Cai Q: **Constitutive Activation of Interleukin-13/STAT6 Contributes to Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Related Primary Effusion Lymphoma Cell Proliferation and Survival.** *J Virol* 2015, **89**:10416–10426.
69. Wurster a L, Tanaka T, Grusby MJ: **The biology of Stat4 and Stat6.** *Oncogene* 2000, **19**:2577–2584.
70. Goenka S, Kaplan MH: **Transcriptional regulation by STAT6.** *Immunol Res* 2011, **50**:87–96.
71. Belardelli F, Ferrantini M: **Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity.** *Trends Immunol* 2002, **23**:201–208.
72. Minton K: **Antiviral immunity: Rapid response team.** *Nat Rev Immunol* 2011, **11**:504–504.
73. Garber-morales J, Holmes-hampton GP, Miao R, Guo Y, Lindahl PA: **The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation.** *Fate iPSCs Deriv from Azoospermic Fertile Men Follow Xenotransplantation to Murine Semin Tubules* 2011, **49**:5436–5444.
74. Lecat A, Piette J, Legrand-Poels S: **The protein Nod2: an innate receptor more complex than previously assumed.** *Biochem Pharmacol* 2010, **80**:2021–31.
75. Argyris EG, Acheampong E, Wang F, Huang J, Mukhtar M, Zhang H: **Central Nervous System.** *October* 2009, **367**:440–451.
76. Norman JM, Mashiba M, McNamara L a, Onafuwa-Nuga A, Chiari-Fort E, Shen W, Collins KL: **The antiviral factor APOBEC3G enhances the recognition of HIV-infected primary T cells by natural killer cells.** *Nat Immunol* 2011, **12**:975–83.
77. Pauli E-K, Schmolke M, Hofmann H, Ehrhardt C, Flory E, Münk C, Ludwig S: **High level expression of the anti-retroviral protein APOBEC3G is induced by influenza A virus but**

does not confer antiviral activity. *Retrovirology* 2009, **6**:38.

78. Kim HJ, Kim C-H, Ryu J-H, Kim M-J, Park CY, Lee JM, Holtzman MJ, Yoon J-H: **Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN- λ regulation in human nasal epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013, **49**:855–65.

79. Brien JD, Daffis S, Lazear HM, Cho H, Suthar MS, Gale M, Diamond MS: **Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) shapes both innate and CD8(+) T cell immune responses against West Nile virus infection.** *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1002230.

80. Pine R: **Convergence of TNF α and IFN γ signalling pathways through synergistic induction of IRF-1/ISGF-2 is mediated by a composite GAS/kB promoter element.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:4346–4354.

81. Li W, Katz BP, Spinola SM: **Haemophilus ducreyi lipooligosaccharides induce expression of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase via type I interferons and tumor necrosis factor alpha in human dendritic cells.** *Infect Immun* 2011, **79**:3338–47.

82. Mao R, Zhang J, Jiang D, Cai D, Levy JM, Cuconati A, Block TM, Guo J-T, Guo H: **Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates the antiviral effect of gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells.** *J Virol* 2011, **85**:1048–1057.

83. Hardaker EL, Bacon AM, Carlson K, Roshak AK, Foley JJ, Schmidt DB, Buckley PT, Comegys M, Panettieri RA, Sarau HM, Belmonte KE: **Regulation of TNF- α - and IFN- γ -induced CXCL10 expression: participation of the airway smooth muscle in the pulmonary inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease.** *FASEB J* 2004, **18**:191–193.

84. Peperzak V, Veraar E a M, Xiao Y, Babala N, Thiadens K, Brugmans M, Borst J: **CD8⁺ T cells produce the chemokine CXCL10 in response to CD27/CD70 costimulation to promote generation of the CD8⁺ effector T cell pool.** *J Immunol* 2013, **191**:3025–36.

85. Ivashkiv LB, Donlin LT: **Regulation of type I interferon responses.** *Nat Rev Immunol* 2014, **14**:36–49.

86. Fink K, Martin L, Mukawera E, Chartier S, De Deken X, Brochiero E, Miot F, Grandvaux N: **IFN β /TNF α synergism induces a non-canonical STAT2/IRF9-dependent pathway triggering a novel DUOX2 NADPH oxidase-mediated airway antiviral response.** *Cell Res* 2013, **23**:673–90.

87. Bartee E, Mohamed MR, Lopez MC, Baker H V, McFadden G: **The addition of tumor necrosis factor plus beta interferon induces a novel synergistic antiviral state against poxviruses in primary human fibroblasts.** *J Virol* 2009, **83**:498–511.
88. Błaszczyk K, Olejnik A, Chmielewski S, Kostyrko K, Wesoly J, Lee C-K, Bluysen HAR: **STAT2 and IRF9-dependent IFN-I signaling restores ISRE-mediated transcription and anti-viral activity independent of STAT1.** *Cytokine* 2013, **63**:248–249.
89. Wang Y, Wu TR, Cai S, Welte T, Chin YE: **Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:4505–4512.
90. Grandvaux N, TenOever BR, Servant MJ, Hiscott J: **The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion.** *Curr Opin Infect Dis* 2002, **15**:259–267.
91. Grandvaux N, Servant MJ, TenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, Lin R, Hiscott J: **Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes.** *J Virol* 2002, **76**:5532–9.
92. Hofer MJ, Li W, Manders P, Terry R, Lim SL, King NJC, Campbell IL: **Mice deficient in STAT1 but not STAT2 or IRF9 develop a lethal CD4+ T-cell-mediated disease following infection with lymphocytic choriomeningitis virus.** *J Virol* 2012, **86**:6932–46.
93. Perry ST, Buck MD, Lada SM, Schindler C, Shresta S: **STAT2 mediates innate immunity to dengue virus in the absence of STAT1 via the type I interferon receptor.** *PLoS Pathog* 2011, **7**.
94. Lou Y-J, Pan X-R, Jia P-M, Li D, Xiao S, Zhang Z-L, Chen S-J, Chen Z, Tong J-H: **IFR-9/STAT2 Functional Interaction Drives Retinoic Acid-Induced Gene G Expression Independently of STAT1.** *Cancer Res* 2009, **69**:3673–3680.
95. Bluysen H a, Levy DE: **Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence-specific contacts provided by stat1 and p48 for stable interaction with DNA.** *J Biol Chem* 1997, **272**:4600–5.
96. Martinez-Moczygemba M, Gutch MJ, French DL, Reich NC: **Distinct STAT structure promotes interaction of STAT2 with the p48 subunit of the interferon-alpha-stimulated transcription factor ISGF3.** *J Biol Chem* 1997, **272**:20070–20076.
97. Błaszczyk K, Olejnik A, Nowicka H, Ozgyn L, Chen Y-L, Chmielewski S, Kostyrko K, Wesoly J, Balint BL, Lee C-K, Bluysen H a R: **STAT2/IRF9 directs a prolonged ISGF3-**

like transcriptional response and antiviral activity in the absence of STAT1. *Biochem J* 2015, **466**:511–24.

98. Bluysen H: **STAT2-directed pathogen responses.** *Oncotarget* 2015, **6**:2–3.

99. Schroder AJ, Pavlidis P, Arimura A, Capece D, Rothman PB: **Cutting edge: STAT6 serves as a positive and negative regulator of gene expression in IL-4-stimulated B lymphocytes.** *J Immunol* 2002, **168**:996–1000.

100. Cruz R: **Interleukin-4 Suppression of Tumor Necrosis Factor alpha -stimulated E-selectin Gene Transcription Is Mediated by STAT6 Antagonism of NF-kappa B.** *J Biol Chem* 1997, **272**:10212–10219.

101. Shelburne CP, Piekorz RP, Bouton LA, Jin Chong H, Ryan JJ: **Mast cell-restricted p70 stat6 isoform is a product of selective proteolysis.** *Cytokine* 2002, **19**:218–227.

102. Sehgal PB: **Non-genomic STAT5-dependent effects at the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and STAT6-GFP in mitochondria.** 2013(December):1–9.

103. Delgoffe GM, Vignali DAA: **STAT heterodimers in immunity: A mixed message or a unique signal?** *Jak-Stat* 2013, **2**:e23060.

104. Lahiri S, Seidel R, Engelhard M, Becker CFW: **Photocontrol of STAT6 dimerization and translocation.** *Mol Biosyst* 2010, **6**:2423–9.

105. Wick KR, Berton MT: **IL-4 induces serine phosphorylation of the STAT6 transactivation domain in B lymphocytes.** *Mol Immunol* 2000, **37**:641–52.

106. Decker T, Kovarik P: **Serine phosphorylation of STATs.** *Oncogene* 2000, **19**:2628–37.

107. Cui X, Zhang L, Luo J, Rajasekaran a, Hazra S, Cacalano N, Dubinett SM: **Unphosphorylated STAT6 contributes to constitutive cyclooxygenase-2 expression in human non-small cell lung cancer.** *Oncogene* 2007, **26**:4253–4260.

108. Guerra I, Pérez-Jeldres T, Iborra M, Algaba A, Monfort D, Calvet X, Chaparro M, Mañosa M, Hinojosa E, Minguez M, Ortiz de Zarate J, Márquez L, Prieto V, García-Sánchez V, Guardiola J, Rodríguez GE, Martín-Arranz MD, García-Tercero I, Sicilia B, Masedo Á, Lorente R, Rivero M, Fernández-Salazar L, Gutiérrez A, Van Domselaar M, López-SanRomán A, Ber Y, García-Sepulcre M, Ramos L, Bermejo F, et al.: **Incidence, Clinical Characteristics, and Management of Psoriasis Induced by Anti-TNF Therapy in Patients with Inflammatory Bowel Disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2016, **22**:1.

109. Rozieres A, Hennino A, Nicolas J-F: **Articles scientifiques Regards sur la recherche**

Le TNF-alpha dans la physiopathologie du psoriasis. *Ann Dermatol Venereol* 2006, **133**:174–80.

110. Glass WG, Rosenberg HF, Murphy PM: **Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003, **3**:467–473.

111. Tato CM, Cua DJ: **SnapShot: Cytokines IV.** *Cell* 2008, **132**:24–25.

112. Tato CM, Cua DJ: **Cytokines I.** *Cell* 2008, **132**(Janvier):16–17.

113. Tato CM, Cua DJ: **Cytokines III.** *Cell* 2008, **137**(March):900–9001.

114. Redgrove KA, McLaughlin EA: **The role of the immune response in chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: A double-edged sword.** *Front Immunol* 2014, **5**(OCT):1–22.

115. Li Y, Wang Y, Liu X: **The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection.** *Clin Dev Immunol* 2012, **2012**.

116. Maelfait J, Roose K, Vereecke L, Mc Guire C, Sze M, Schuijs MJ, Willart M, Itati Ibañez L, Hammad H, Lambrecht BN, Beyaert R, Saelens X, van Loo G: **A20 Deficiency in Lung Epithelial Cells Protects against Influenza A Virus Infection.** *PLOS Pathog* 2016, **12**:e1005410.

117. Casola A, Garofalo RP, Haeberle H, Elliott TF, Lin R, Jamaluddin M, Brasier AR: **Multiple cis Regulatory Elements Control RANTES Promoter Activity in Alveolar Epithelial Cells Infected with Respiratory Syncytial Virus Multiple cis Regulatory Elements Control RANTES Promoter Activity in Alveolar Epithelial Cells Infected with Respirato.** *Society* 2001, **75**:6428–6439.

118. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG: **IY29CH04-Ouyang Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease.** *Annu Rev Immunol* 2011, **29**:71–109.

119. Fallis A.: **Signalisation cellulaire et cancer.** *J Chem Inf Model* 2013, **53**:1689–1699.

120. Campbell LM, Maxwell PJ, Waugh DJJ: *Rationale and Means to Target pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer. Volume 6*; 2013.

Articles scientifiques

Video Article

A High Resolution Method to Monitor Phosphorylation-dependent Activation of IRF3

Alexa C. Robitaille^{1,2,3}, Mélissa K. Mariani^{1,3}, Audray Fortin¹, Nathalie Grandvaux^{1,2,3}¹CRCHUM - Research center, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Université de Montréal²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal³Faculty of Medicine, Université de Montréal

* These authors contributed equally

URL: <http://www.jove.com/video/53723>DOI: [doi:10.3791/53723](https://doi.org/10.3791/53723)

Keywords: Molecular Biology, Issue 107, IRF3, Interferon, innate immunity, antiviral, phosphorylation, SDS-PAGE, native-PAGE, dimerization, high resolution, phosphospecific antibodies, immunoblot, virus infection.

Date Published: 1/24/2016

Citation: Robitaille, A.C., Mariani, M.K., Fortin, A., Grandvaux, N. A High Resolution Method to Monitor Phosphorylation-dependent Activation of IRF3. *J. Vis. Exp.* (107), e53723, doi:10.3791/53723 (2016).

Abstract

The IRF3 transcription factor is critical for the first line of defense against pathogens mainly through interferon β and antiviral gene expression. A detailed analysis of IRF3 activation is essential to understand how pathogens induce or evade the innate antiviral response. Distinct activated forms of IRF3 can be distinguished based on their phosphorylation and monomer vs dimer status. *In vivo* discrimination between the different activated species of IRF3 can be achieved through the separation of IRF3 phosphorylated forms based on their mobility shifts on SDS-PAGE. Additionally, the levels of IRF3 monomer and dimer can be monitored using non-denaturing electrophoresis. Here, we detail a procedure to reach the highest resolution to gain the most information regarding IRF3 activation status. This is achieved through the combination of a high resolution SDS-PAGE and a native-PAGE coupled to immunoblots using multiple total and phosphospecific antibodies. This experimental strategy constitutes an affordable and sensitive approach to acquire all the necessary information for a complete analysis of the phosphorylation-mediated activation of IRF3.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/53723/>

Introduction

The ubiquitously and constitutively expressed transcription factor Interferon (IFN) Regulatory Factor 3 (IRF3) is critical for the first line of defense against pathogens mainly through the induction of IFN β , but also through the induction of the chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) and several antiviral proteins including IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats IFIT1/2/3¹⁻³. IRF3 activation has been reported following infection with numerous viruses, or exposure to polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) or lipopolysaccharide (LPS)⁴. Importantly, most studied viruses have evolved mechanisms to evade the IRF3-mediated response, and thereby escape the host innate immune defense⁵. Thus, monitoring IRF3 activation is of great importance to understand the molecular mechanisms of the innate antiviral host defense, but also to identify the strategy used by viruses to counteract this response.

Many published reports however provide only a limited analysis of IRF3 activation performed by the monitoring of IRF3-target gene induction (*IFNB1* and *IFIT1*) and/or luciferase reporter gene assay coupled to low resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of IRF3. However, numerous biochemical studies, analysis of the behavior of various IRF3 mutants and elucidation of IRF3 crystal structure⁶⁻¹¹ have contributed to establish that IRF3 is subjected to a complex set of sequential post-translational modifications by phosphorylation at multiple sites. The set of phosphorylation involved in IRF3 activation appears to be dependent on the stimulus and most likely on the cell type. In uninfected cells, IRF3 coexists as non-phosphorylated and hypophosphorylated species containing phosphoresidues, including Thr135 and Ser173, in the 1-198 aa N-terminal region^{6,12-14}. Accumulation of this hypophosphorylated form of IRF3 is induced by stress inducers, growth factors and DNA-damaging agents⁵. Phosphorylation of Ser/Thr residues at the C-terminal region of IRF3 containing the transactivation domain is triggered following activation by viruses, poly I:C or LPS in a cell-type dependent manner¹⁵⁻¹⁷. C-terminal phosphorylation of IRF3 involves no less than 7 distinct phosphoacceptor sites organized in two main clusters, Ser385/Ser386 and Ser396/Ser398/Ser402/Thr404/Ser405, that each contribute to IRF3 activation through dimerization, nuclear accumulation, association with the CREB-binding protein (CBP)/p300 coactivators, DNA binding to IFN sensitive response element (ISRE) consensus sequences and transactivation of target genes^{9,10,17-19}. Phosphorylation of Thr390 is also thought to contribute to virus-induced IRF3 activation²⁰. Mass spectrometry analyses of IRF3 have demonstrated that Ser386, Thr390, Ser396 and Ser402 residues are directly phosphorylated by the inhibitor of κ B kinase ϵ (IKK ϵ)/TANK-binding kinase 1 (TBK1) kinases^{9,10}. Phosphorylation at the C-terminal residues is also required for termination of IRF3 activation through polyubiquitination and proteasome-mediated degradation¹⁰. This process is also dependent on the phosphorylation at Ser339, which is necessary for the recruitment of the propyl isomerase Pin1^{10,11}. IRF3 species containing at least phospho-Ser339/386/396 residues are

considered hyperphosphorylated forms. The exact sequence and function of each site remains a matter of discussion^{10,21}. It is now clear that activated IRF3 does not represent a homogeneous state, but that different activated species exhibiting distinct phosphorylation or dimerization characteristics exist^{10,22}.

To provide a complete understanding of IRF3 activation in response to specific pathogens, it is thus necessary to characterize which of the activated species are induced. Induction of IRF3 target genes, *IFNB1* and *IFIT1*, has proven to provide a reliable read-out for IRF3 activation. However, monitoring expression of these genes does not distinguish between different activation states of IRF3. A comprehensive analysis of IRF3 activation states in a particular setting relies on the detailed characterization of its phosphorylation and dimerization status¹⁰. Unphosphorylated (form I), hypophosphorylated (form II) and hyperphosphorylated (forms III and IV) IRF3 forms^{6,18,23} can be successfully resolved by reduced mobility in high-resolution SDS-PAGE analysis. Monomeric and dimeric IRF3 species can be efficiently identified by native-PAGE analysis. These approaches are greatly improved when used in combination with phosphospecific antibodies directed against distinct IRF3 phosphoacceptor sites.

Standard protocols allow a poor resolution of proteins that does not permit efficient separation of distinct IRF3 phosphorylated forms. Here, we describe in detail a procedure to achieve the highest resolution to monitor the induction of distinct virus-activated IRF3 species using SDS-PAGE coupled to native-PAGE in combination with immunoblot using total and phosphospecific antibodies. *In vivo* discrimination between the different activated forms of IRF3 is performed based on their mobility shifts observed on SDS-PAGE. Additionally, IRF3 monomer and dimer can be distinguished by non-denaturing electrophoresis. The combination of these two complementary techniques with immunoblot proves to be an affordable and sensitive approach to acquire all the necessary information for a complete analysis of phosphorylation-mediated activation of IRF3.

Protocol

NOTE: The protocol is described here using A549 cells infected with Sendai virus (SeV). However, the protocol for SDS-PAGE and native PAGE also works with all human and murine cell types tested so far, particularly myeloid cells stimulated with various IRF3-activating stimuli^{9,15,19,24,25}.

1. Infection of A549 Cells

- Maintain A549 cells in culture in a 15 cm plate at 37 °C/5% CO₂ in 20 ml F12K/Ham medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HI-FBS) and 1% L-glutamine (complete F12K/Ham medium).
NOTE: All the solutions used for cell culture and treatments must be sterile.
- At 24 hr before the infection, aspirate the medium and wash the cells with 10 ml of distilled phosphate buffered saline (D-PBS) at RT.
- Add 1 ml of 0.25% trypsin-EDTA solution to each plate to cover the cells and incubate at 37 °C for 3 min.
- Stop the incubation as soon as the cells start to detach from the plate by softly tapping the plate with one hand. Inactivate the trypsin by adding 10 ml of pre-heated complete F12K/Ham medium per plate and transfer the cells to a 15 ml conical tube.
- Centrifuge at 350 x g for 3 min at RT. Remove the supernatant and resuspend the cell pellet in 8 ml of complete F12K/Ham medium to obtain a homogeneous single cell suspension.
- Count the cells using a hemocytometer. Seed the cells at a density of 1 x 10⁵ cells per 60 mm plate in 4 ml of pre-heated complete F12K/Ham medium. Incubate for 20 - 24 hr at 37 °C/5% CO₂. After 20 - 24 hr, the cells form a 90% confluent monolayer (this corresponds to 1.5 x 10⁶ cells).
- Remove the medium and wash the cells with 2 ml of serum-free F12K/Ham medium (SFM). Add 2 ml of fresh SFM per 60 mm plate.
- Thaw an aliquot of Sendai virus (SeV) (stored aliquoted at -80 °C) on ice and vortex briefly.
- Dilute the virus in pre-heated SFM to obtain 60 HAU/100 µl. Mix by pipetting up and down softly and add 100 µl of diluted virus per plate to perform the infection at 40 HAU/10⁶ cells. Do not add virus in the non-infected control plate.
- Incubate the cells in the incubator at 37 °C/5% CO₂. Agitate the plates by hand 3 or 4 times, or using an automatic orbital or rocking shaker placed directly in the incubator, during the first hour of infection.
- At 2 hr post-infection, add 2 ml of F12K/Ham medium containing 20% HI-FBS to obtain a final concentration of 10% HI-FBS.
- Incubate the cells in the incubator at 37 °C/5% CO₂ for an additional 1, 4 and 7 hr to reach total infection times of 3, 6, and 9 hr, respectively. At each of these time points, proceed to step 2.1.

2. Preparation of Whole Cell Extracts (WCE)

- Remove the infection medium. Harvest the cells by scraping in 1 ml of ice-cold D-PBS and transfer the cell suspension to a pre-chilled 1.5 ml centrifuge tube.
- Pellet the cells by centrifugation at 16,000 x g at 4 °C for 20 sec and carefully decant all traces of D-PBS.
NOTE: At this step, the cell pellet can be directly subjected to protein extraction or flash-frozen in liquid nitrogen or dry ice/ethanol bath and stored at -80 °C until lysis.
- Prepare the lysis buffer containing 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol and 1% Nonidet P-40 in deionized water (ddH₂O). Extemporarily add protease (1 µg/ml leupeptin and 2 µg/ml aprotinin) and phosphatase inhibitors (5 mM sodium fluoride, 1 mM activated sodium orthovanadate, 2 mM p-nitrophenyl phosphate and 10 mM β-glycerophosphate pH 7.5).
NOTE: The lysis buffer without inhibitors can be stored at 4 °C. A specific protocol for the activation of sodium orthovanadate is described in the Table of Specific Reagents/Equipment.
- Resuspend the cell pellet in 70 µl of lysis buffer. Typically the lysate concentration will be around 2 µg/µl.
- Incubate on ice for 20 min. Flash-freeze the lysate by incubation in a liquid nitrogen bath for 15 sec. Thaw the lysate at RT until it is completely melted and vortex for 10 sec. Repeat the freeze/thaw/vortex cycle 3 times.
 - Alternatively, perform the freezing step in an ethanol/dry ice bath for 1 min.

- Centrifuge at 16,000 x g at 4 °C for 20 min. Transfer the supernatant (corresponding to the WCE) to a new pre-chilled 1.5 ml centrifuge tube. Keep the WCE on ice at all times.
- Quantify proteins using any protein quantification procedure compatible with the lysis buffer such as Bradford-based protein assay²⁶.

3. Resolution of WCE by High Resolution SDS-PAGE

- Prepare three denaturing electrophoresis gels.
 - For the detection of IRF3 forms, pour two gels of a minimum of 16 cm length with a separation gel composed of 7.5% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1), 375 mM Tris-HCl pH 8.8 (RT), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% ammonium persulfate and 0.1% TEMED in ddH₂O and a stacking gel composed of 4% acrylamide, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 (RT), 0.05% SDS, 1% ammonium persulfate and 0.1% TEMED in ddH₂O.
Caution! Acrylamide, TEMED and SDS are toxic and/or irritant. Wear protective gloves and manipulate under a fume hood.
 - For the detection of SeV proteins, pour one gel of a minimum of 8.5 cm length with characteristics similar to the gel described in 3.1.1, except that the separation gel contains 12% acrylamide.
- Denature the WCE obtained in step 2.6 by adding 1:4 (v/v) 5x loading buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8 (RT), 10% SDS, 20% (p/v) glycerol, 0.0005% bromophenol blue and 25% β-mercaptoethanol in ddH₂O) followed by heating at 100 °C for 10 min. Quick spin the tubes to bring down the condensation that forms in the cap.
Caution! β-mercaptoethanol is toxic by inhalation. Wear protective gloves and manipulate under a fume hood.
- Mount the gels in the migration apparatus. Fill the upper and lower chambers with running buffer containing 25 mM Tris-Base, 0.1% SDS and 192 mM glycine in distilled water (dH₂O).
- Load 14 μl of molecular weight standard in one well of each 16 cm gel and 7 μl of molecular weight standard in one well of the 8.5 cm gel. Load 30 μg of denatured WCE (prepared as described in step 3.2) per well of the two gels prepared in step 3.1.1 for IRF3 forms detection. Load 8 - 10 μg of denatured WCE (prepared as described in step 3.2) per well on the gel prepared in step 3.1.2 for SeV analysis.
- Run the gels at 30 mA constant current until the migration front reaches the bottom of the gel.
NOTE: Migration typically lasts approximately 3 hr for a 16 cm gel and 45 min for an 8.5 cm gel.
- Proceed to the transfer onto nitrocellulose membranes (step 5).

4. Analysis of IRF3 Dimerization by Native-PAGE

NOTE: This method was originally described by the group of Dr. T. Fujita²⁷.

- Prepare the upper (-) and lower (+) chamber electrophoresis buffers. The upper chamber buffer consists of 25 mM Tris-HCl pH 8.4 (RT), 192 mM glycine and 1% sodium deoxycholate (DOC) in ddH₂O. The lower chamber buffer contains 25 mM Tris-HCl pH 8.4 (RT) and 192 mM glycine in ddH₂O.
NOTE: The upper and lower chamber electrophoresis buffers can be stored at 4 °C until use. However, make sure that they are pre-warmed to RT before performing the electrophoresis.
- Pour a non-denaturing resolving gel of a minimum of 8.5 cm length containing 7.5% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1), 375 mM Tris-HCl pH 8.8 (RT), 1% ammonium persulfate and 0.1% TEMED in ddH₂O.
- Pre-run the gel at 40 mA constant current for 30 min on ice. Press the running apparatus into the ice approximately to the level of the lower chamber electrophoresis buffer. It is important that the gel is not in the ice.
- During pre-run, mix WCE kept on ice with 2x native-PAGE loading buffer 1:1 (v/v) containing 125 mM Tris-HCl pH 6.8 (RT), 30% glycerol and 0.1% bromophenol blue in ddH₂O.
- Load 8 - 10 μg WCE (prepared as described in step 4.4) immediately at the end of the pre-run.
- Run the gel at 25 mA constant current on ice, as described above for the pre-run, until the migration front reaches the bottom of the gel (approximately 40 min).

5. Immunoblot Analysis of IRF3 Species

- Prepare the transfer buffer containing 25 mM Tris-Base and 192 mM glycine in ddH₂O. Refrigerate the transfer buffer at 4 °C before use.
- Wet three pieces of nitrocellulose membrane cut to a size slightly larger than the gels in a plastic/glass box containing the transfer buffer. Indicate the orientation of the membrane by cutting one corner. The transfer buffer can be reused 3 times. Store the buffer at 4 °C between uses.
- Uncast the gels (SDS-PAGE and native-PAGE) and cut one corner of each gel for proper orientation.
 - For native-PAGE, incubate the gel at RT with gentle agitation for at least 30 min in the SDS-PAGE running buffer to remove the DOC before transferring to the transfer buffer.
- Incubate the gels (SDS-PAGE and native-PAGE) in the transfer buffer for 5 - 10 min.
- Mount a transfer sandwich per gel in a transfer cassette with the membrane towards the positive electrode (foam pad/filter paper/membrane/gel/filter paper/foam pad). Be careful to remove all the bubbles in between the layers of the sandwich.
- Perform the transfer as recommended by the manufacturer for the transfer apparatus used.
NOTE: Perform all incubations and washes in the next steps on a rocking or orbital shaking platform.
- At the end of the transfer time, incubate the membranes for 15 min in the fixation solution containing 7% acetic acid, 40% ethanol and 3% glycerol in ddH₂O. Wash the membranes 3x 5 min in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.2 mM Na₂HPO₄ and 1.8 mM KH₂PO₄ in dH₂O).
Caution! Acetic acid is toxic, irritant and flammable. Wear protective gloves and manipulate under the fume hood.
NOTE: The fixation solution can be reused multiple times.
- For the native-PAGE membrane proceed directly to step 5.11.

9. Rinse the three SDS-PAGE membranes quickly in dH₂O before incubating them for 1 min in red ponceau solution containing 6.57 mM red ponceau and 1% acetic acid in ddH₂O.
NOTE: The red ponceau solution can be reused several times.
10. Rinse the membranes in dH₂O until the background is white enough to see the protein bands stained in red. Note the markers with a pencil and cut the excess membrane around the proteins. Destain the membranes by incubation for 5 min in PBS under agitation.
11. Incubate the membranes for 1 hr at RT or O/N at 4 °C in the blocking solution (PBS containing 0.05% Tween 20 and 5% non-fat dry milk (PBS-T-milk). Wash the membranes 3x 5 min in PBS-T.
NOTE: The PBS-T wash is optional and only strictly required when applying antibodies diluted in PBS-T containing 5% bovine serum albumin (PBS-T-BSA) (Figure 1 and Table 1) in the next step.
12. Incubate the four membranes (from SDS-PAGE and native-PAGE) with the primary antibodies according to the sequential order detailed in Figure 1 and Table 1. Perform 5x 5 min washes in PBS-T.

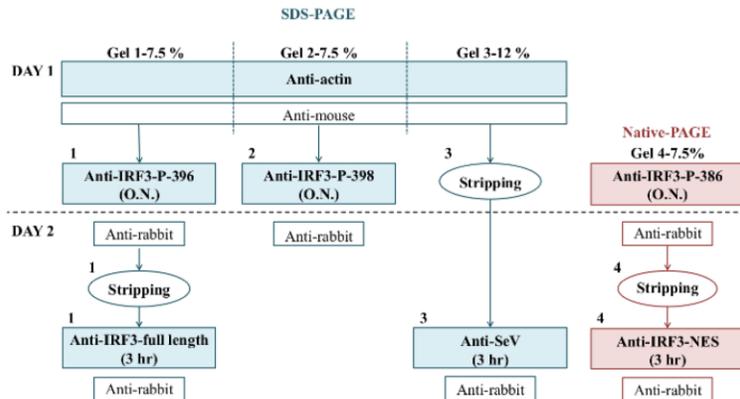


Figure 1. Sequence of Immunoblot Analyses. The schematic describes the individual SDS-PAGE and native-PAGE gels required to detect the various IRF3 phosphorylated and monomeric/dimeric forms. The specific order of antibodies applied to the membrane resulting from each gel in the immunoblot procedure is described. Note that the anti-actin antibodies are used first to ensure equal loading of the samples before applying any other specific antibodies. The alternate sequence, with anti-actin antibodies being applied after the anti-phospho-IRF3 antibodies, also works. Stripping is used between anti-actin and anti-SeV antibodies, or between anti-phospho-IRF3 and anti-IRF3 antibodies because of overlapping size of the signals. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Primary antibodies	Dilution	Dilution buffer	Incubation	Secondary antibodies	Comments
Anti-Actin	1/10,000	PBS-T-BSA	15 min at RT	Anti-mouse	Use after SDS-PAGE. Diluted antibodies can be reused several times if stored at 4 °C in the presence of 0.02 % Sodium Azide.
Anti-IRF3-P-Ser386	1/200	PBS-T-BSA	O/N at 4 °C	Anti-rabbit	Use after Native-PAGE. It is not recommended to reuse the diluted antibody
Anti-IRF3-P-Ser396	1/10,000	PBS-T-BSA	O/N at 4 °C	Anti-rabbit	Use after SDS-PAGE. It is not recommended to reuse the diluted antibody. Anti-IRF3-P-396 is also available from Cell Signaling. Optimal dilution was defined as 1/1,000 for this antibody, but may vary between lots.
Anti-IRF3-P-Ser398	1/10,000	PBS-T-BSA	O/N at 4 °C	Anti-rabbit	Use after SDS-PAGE. It is not recommended to reuse the diluted antibody
Anti-IRF3 full length	1/7,500	PBS-T-milk	3 hr at RT	Anti-rabbit	Use after SDS-PAGE. Anti-IRF3 full length antibody can be used after native-PAGE, but it is less sensitive to detect the monomer. Diluted antibodies can be reused several times if stored at 4 °C in the presence of 0.02 % Sodium Azide.
Anti-IRF3-NES	0.5 µg/ml	PBS-T-milk	3 hr at RT	Anti-rabbit	Use after Native-PAGE. Diluted antibodies can be reused several times if stored at 4 °C in the presence of 0.02 % Sodium Azide.
Anti-SeV	1/14,000	PBS-T-BSA	3 hr at RT	Anti-rabbit	Use after SDS-PAGE. Diluted antibodies can be reused several times if stored at 4 °C in the presence of 0.02 % Sodium Azide.

NOTE: Dilution and buffer used for HRP-coupled secondary antibodies need to be optimized as it varies from one company to the other.

Table 1. Specifications of Antibodies used in the Immunoblotting Procedure.

13. Incubate the membranes with the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies as detailed in **Figure 1** and **Table 1**. Wash the membranes 5x 5 min in PBS-T, followed by 2x 5 min in PBS to fully remove traces of Tween.
14. Incubate the membranes for 1 min in a volume of enhanced chemiluminescence reagent sufficient to fully cover the membranes. Dry the membranes using filter paper.
15. Place the membranes in a luminescent image analyzer to visualize the immunoreactive bands.
 1. Alternatively, perform the detection of immunoreactive bands using sensitive X-Ray films.
16. Wash the membranes 3x 5 min in PBS.

NOTE: At this step the membranes can be kept dry. However, if further stripping is required, it is better to perform the stripping before drying the membrane. Membranes can also be stored for short-term in PBS.
17. For the membranes that do not require stripping between incubation with antibodies (see **Figure 1**) proceed directly to step 5.20.

18. When stripping is required between antibodies (see **Figure 1**), incubate the membranes in pre-warmed stripping solution containing 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 (RT) and 0.7% β -mercaptoethanol in ddH₂O at 50 °C for 20 min under regular agitation. Wash the membranes 3x 5 min in PBS.
NOTE: Agitation during the stripping procedure is key. Stripping can be performed in a hybridization oven. Alternatively, stripping can be performed using membranes sealed in plastic bags and immersed in a water bath. In this case, it is important to agitate the membranes 4 - 5 times during the incubation.
19. Incubate the membranes for 1 hr at RT or O/N at 4 °C in PBS-T-milk.
20. Repeat steps 5.12 to 5.16 according to **Figure 1**.

Representative Results

Figure 2 shows a typical immunoblot image of IRF3 detected with IRF3 total antibodies and IRF3-phosphospecific antibodies against Ser396 and Ser398 after resolution of WCE by high-resolution SDS-PAGE. In unstimulated A549 cells, IRF3 is detected as two bands at 50 and 53 kDa on the SDS-PAGE corresponding to the non-phosphorylated (form I) and the hypophosphorylated (form II) species of IRF3. Exposure of A549 cells to SeV for 3 - 9 hr results in a time-dependent shift to slowly migrating hyperphosphorylated forms III and IV, which are well distinguished from the forms I and II. The hyperphosphorylated bands migrate at 55-57 kDa. The forms III and IV are also specifically immunodetected using the phosphospecific antibodies against Ser396 and Ser398. The immunodetection of actin serves as a control of equal loading between the lanes. A control of SeV infection is shown by the accumulation of the virus nucleocapsid protein (N), which migrates at 60 kDa.

In **Figure 3**, the profile of detection of IRF3 obtained from WCE resolved by native-PAGE followed by immunoblot using anti-IRF3-NES antibodies and phosphospecific antibodies against Ser386 is shown. In unstimulated A549 cells, IRF3 is detected as a single band corresponding to the monomeric form. Upon infection with SeV for 3 - 9 hr, the levels of IRF3 monomer decrease with a concomitant accumulation of a slowly migrating band that corresponds to the dimeric form of IRF3. The phosphospecific antibodies against Ser386 only detect IRF3 dimer species.

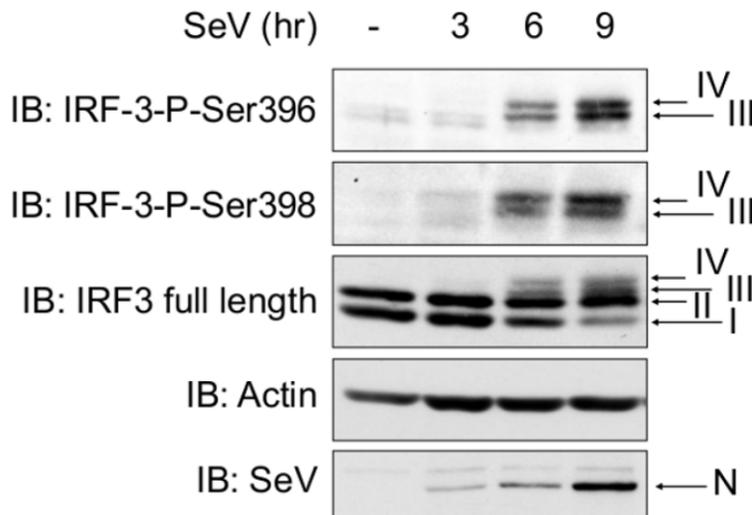


Figure 2. Detection of Distinct IRF3 Phosphorylated Species (form I-IV) Induced by SeV Infection in A549 Cells. A549 cells were left uninfected or infected with SeV for the indicated times. WCE were analysed by high-resolution SDS-PAGE followed by immunoblot (IB) using anti-IRF3-Ser396 (IRF-3-P-Ser396) and anti-IRF3-Ser398 (IRF-3-P-Ser398) phosphospecific antibodies and anti-IRF3 full length protein antibodies. The infection was monitored using anti-SeV antibodies (the nucleocapsid N protein is shown). Anti-actin antibodies were used as a loading control. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

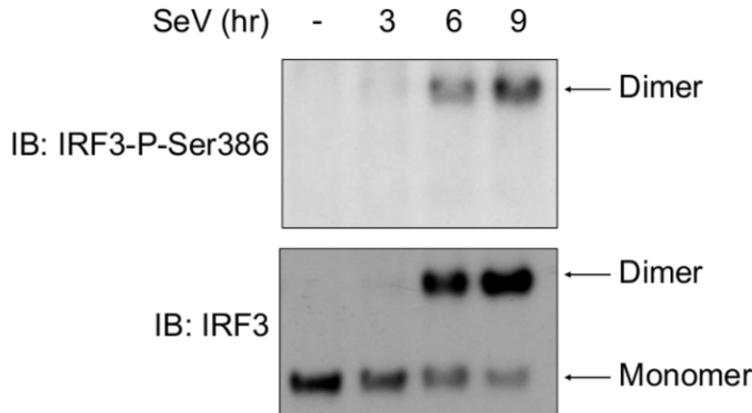


Figure 3. Monitoring of Phosphorylated/dimerized IRF3 Induction by SeV in A549 Cells. A549 cells were left uninfected or infected with SeV for the indicated times. WCE were resolved by native-PAGE and revealed by immunoblot using anti-IRF3-Ser386 (IRF3-P-Ser386) phosphospecific antibodies and anti-IRF3-NES antibodies. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

The protocol we describe here consists of a combination of high-resolution SDS-PAGE and native-PAGE coupled to the use of several phosphospecific antibodies to distinguish the monomeric/dimeric and phosphoforms I-IV of IRF3. Appropriate detection of these IRF3 species is essential to fully characterize IRF3 activation in a specific setting. For instance, LPS stimulation of activated macrophages leads to the formation of dimeric, Ser396/398 phosphorylated IRF3 that exhibits a hypophosphorylated (form II), but not hyperphosphorylated (form III and IV), pattern in SDS-PAGE¹⁵. Using the described protocol, this profile can be distinguished from virus-induced hyperphosphorylated forms that require additional Ser339 phosphorylation in addition to Ser386 and Ser396 phosphorylation¹⁰. Importantly, this also allows discriminating between Ser396 phosphorylated species that do not exhibit dimerization, but are transcriptionally active¹⁰. Importantly, it needs to be noted that the form I-IV pattern of IRF3 phosphoforms applied to human IRF3. Murine IRF3 does not exhibit a similar pattern and therefore activation of IRF3 is characterized only by the use of phosphospecific antibodies in immunoblot after SDS-PAGE and by native-PAGE.

The achievement of a high resolution separation of the distinct phosphorylated species of IRF3 by SDS-PAGE requires specific parameters. For appropriate resolution, it is very important to use gels that have a minimum length of 16 cm. Even with this length of separation gel, it is key to let the migration front reach the bottom of the gel to obtain an appropriate separation of the different IRF3 forms. Also, the stacking gel must extend to a minimum of 1 cm below the comb to obtain well-defined bands. This is important, as the hyperphosphorylated forms of IRF3 migrate very close to one another. Poorly focused bands will result in lack of distinction between phosphorylated forms impairing their respective quantification. Additionally, the concentration of ammonium persulfate and TEMED vary from one SDS-PAGE protocol to another. Variation in these concentrations from the ones indicated here was found to significantly impair the resolution in the separation of the IRF3 species.

Detection of IRF3 dimer formation through the native-PAGE was originally described by the group of Dr. T. Fujita. This protocol uses buffer containing DOC that allows the dissociation of the IRF3 dimer from CBP/p300²⁷. It is highly recommended to proceed to native-PAGE immediately after cell lysis as storage of the WCE at -80 °C was found to result in a significant alteration of the IRF3 monomer/dimer ratio. Additionally, it is very important that the pH of the upper and lower chamber buffers is adjusted to pH 8.4 at RT, and not at 4 °C, after mixing all components to achieve proper separation of the monomer vs dimer. A separation gel with a minimum length of 8.5 cm allows appropriate separation of IRF3 monomer and dimer. The ideal volume of sample plus loading buffer is around 8 µl for a 5 mm well as the resolution is better when the volume is kept to a minimum. Thus, it is important to use the lowest volume of lysis buffer to obtain WCE with a high concentration. However, it should be taken into account that efficient protein extraction requires lysis in at least 5x the volume of the cell pellet. If the volume of the samples exceeds the limit indicated above, this would result in poor resolution of the monomer/dimer. This can be solved by adding a stacking gel containing 4% acrylamide, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 (RT), 1% ammonium persulfate and 0.1% TEMED in ddH₂O. It is very important to load the samples without disturbing banding. Loading slowly with a gel-loading tip close to the bottom of the well gives very good results.

Here, we describe the *in vivo* detection of phosphorylation at specific residues using currently available phosphospecific antibodies against Ser386⁹, Ser396¹⁹ and Ser398¹⁵. The use of IRF3 mutants and mass spectrometry analyses have confirmed that these residues are phosphorylated upon virus infection or overexpression of IKKε/TBK1 kinases and are critical for IRF3 activation^{6,9,10,19,21}. The immunodetection of phospho-Ser396, phospho-Ser398 and total IRF3 after SDS-PAGE requires the use of two identical gels (Figure 1). Indeed, significant loss of sensitivity is observed when phosphospecific antibodies are used after the stripping of the membrane. Therefore, it is highly recommended to use phosphospecific antibodies first. Note that alternative primary and secondary antibodies may also work, but the specific dilutions and sequence of usage should be optimized. For IRF3 analysis, 30 µg of WCE is appropriate to obtain a significant detection of IRF3 phosphorylation by immunoblot using the indicated antibodies when using 4 mm width wells. Although in many cell types infected with various viruses 30 µg was found to be appropriate, this amount might need to be increased depending on cell type and stimulation. It is preferable to use fresh extracts for SDS-PAGE, but the detection of IRF3 phosphorylation using the phosphospecific antibodies described in this paper is stable enough to allow a round of storage of the WCE at -80 °C before analysis. The concentrations of phosphatase inhibitors described here were found to be sufficient when using A549 cells. Higher concentrations were not found to yield better results. However, these concentrations might need to be increased when studying IRF3 activation in cell types that exhibit higher phosphatase activity levels. Importantly, the phosphorylation of IRF3 and the underlying mechanisms are still far from being understood. Therefore, a full panel of Ser/Thr- and Tyr-phosphatase inhibitors is used to

block possible yet uncharacterized activities that could affect the detection of IRF3 phosphorylation, dimerization and degradation. For detection of IRF3 monomer and dimer after most virus infections and in most cell types, 8 - 10 μg WCE was found to be sufficient. However, higher amount of proteins might be required for stimulation activating IRF3 less efficiently. The phosphospecific antibodies against Ser386 used in this study are recommended to be used in native-PAGE as the sensitivity in denaturing SDS-PAGE is very weak. Moreover, the phosphorylation at Ser386 is proposed to correlate with the dimeric form of IRF3⁹, thus making the use of these antibodies in native-PAGE an appropriate strategy to confirm this concept in a specific setting. Of note, alternative antibodies are available from various companies and are claimed to efficiently detect phospho-Ser386 after SDS-PAGE. Phosphospecific antibodies against Ser396 have also been efficiently used to detect IRF3 phosphorylation after native-PAGE²⁰. Importantly, Ser402 in the C-terminal cluster of phosphoacceptor sites was also found to be important for IRF3 activation and the phosphorylation of Ser402 was observed through mass spectrometry analysis of IKK ϵ /TBK1-phosphorylated IRF3^{10,21,28}. However, despite two different attempts (NG, unpublished), no phosphospecific antibodies are currently available to follow the phosphorylation of this specific residue *in vivo*. Note that phosphospecific antibodies against Thr157 and Ser339 have also been described^{11,13}. These additional phosphospecific antibodies could be used in a procedure of high-resolution SDS-PAGE similar to the one described here. In this case, additional large SDS-PAGE gels would be required for each antibody and processed the same way as gel #2 (Figure 1). To our knowledge no phosphospecific antibodies against Ser173 or Thr390 have yet been described, but they could be easily added to the protocol described here once they become available^{14,20}.

IRF3 activity is terminated by proteasome-mediated degradation of hyperphosphorylated forms^{11,17}. The protocol described here also permits the monitoring of IRF3 degradation when the kinetic of stimulation is prolonged and is coupled to the use of proteasome inhibitors (MG132, lactacystin or bortezomid). Typically, in A549 cells infected with SeV at 40 HAU/10⁶ cells, IRF3 phosphorylation starts as soon as 2 hr post-SeV infection and IRF3 degradation starts after 12 hr. Proteasome-mediated degradation will be concluded from the observed diminution of forms III and IV levels at late time points that is reversed in conditions with proteasome inhibitors. This will also translate on native-PAGE in a diminution of IRF3 dimer levels that are recovered upon proteasome inhibitor treatment²⁹. Importantly, the high-resolution technique presented here allows differentiating between the degradation process and a lack of activation. Indeed, both degradation and lack of activation of IRF3 result in the absence of detection of dimer/phospho-Ser386/396. However, lack of activation is associated with the detection of IRF3 monomer and of forms I and II, while these IRF3 species are not detected when IRF3 is degraded³⁰.

Immunoprecipitation coupled with mass spectrometry-based analysis is a method of choice to detect the *in vivo* phosphorylation of IRF3 at distinct sites. This technique was used to confirm the phosphorylation of IRF3 at Ser173, Ser175, Ser386, Thr390, Ser396 and Ser402 residues^{10,20,21}. However, mass spectrometry is not yet an affordable/benchside technique that can be easily used for daily analysis of IRF3 activation following several stimulations at different time points. Therefore, the procedure described here using SDS-PAGE coupled to native-PAGE in combination with immunoblot using total and phosphospecific antibodies constitutes a practical, affordable and sensitive approach to detect all currently defined forms of activated IRF3.

Disclosures

The authors declare that they have no competing financial interests.

Acknowledgements

The authors thank previous and current members of the laboratory for development of the protocols. The work was supported by funding from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) [grant # MOP-130527] and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [NSERC-355306-2012]. NG is recipient of a Tier II Canada Research Chair. AR holds a studentship from the training program of the Respiratory Health Research Network from the Fonds de la recherche du Québec-Santé (FRQS).

References

1. Juang, Y. T. *et al.* Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95** (17), 9837-9842 (1998).
2. Lin, R., & Hiscott, J. A role for casein kinase II phosphorylation in the regulation of IRF-1 transcriptional activity. *Mol Cell Biochem*. **191** (1-2), 169-180 (1999).
3. Grandvaux, N. *et al.* Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol*. **76** (11), 5532-5539 (2002).
4. Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A., & Fitzgerald, K. A. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*. **3** (6), 920-940 (2011).
5. Grandvaux, N., tenOever, B. R., Servant, M. J., & Hiscott, J. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis*. **15** (3), 259-267 (2002).
6. Servant, M. J. *et al.* Identification of Distinct Signaling Pathways Leading to the Phosphorylation of Interferon Regulatory Factor 3. *J Biol Chem*. **276** (1), 355-363 (2001).
7. Qin, B. Y. *et al.* Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nat Struct Biol*. **10** (11), 913-921 (2003).
8. Takahashi, K. *et al.* X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol*. **10** (11), 922-927 (2003).
9. Mori, M. *et al.* Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as a critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem*. **279** (11), 9698-9702 (2004).
10. Clement, J. F. *et al.* Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *J Virol*. **82** (8), 3984-3996 (2008).
11. Saitoh, T. *et al.* Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol*. **7** (6), 598-605 (2006).

12. Wathelet, M. G. *et al.* Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer *in vivo*. *Mol Cell*. **1** (4), 507-518 (1998).
13. Karpova, A. Y., Trost, M., Murray, J. M., Cantley, L. C., & Howley, P. M. Interferon regulatory factor-3 is an *in vivo* target of DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99** (5), 2818-2823 (2002).
14. Zhang, B. *et al.* The TAK1-JNK cascade is required for IRF3 function in the innate immune response. *Cell Res*. **19** (4), 412-428 (2009).
15. Solis, M. *et al.* Involvement of TBK1 and IKKepsilon in lipopolysaccharide-induced activation of the interferon response in primary human macrophages. *Eur J Immunol*. **37** (2), 528-539 (2007).
16. Soucy-Faulkner, A. *et al.* Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression. *PLoS Pathog*. **6** (6), e1000930 (2010).
17. Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M., & Hiscott, J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*. **18** (5), 2986-2996, (1998).
18. Yoneyama, M. *et al.* Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J*. **17** (4), 1087-1095 (1998).
19. Servant, M. J. *et al.* 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** (11), 9441-9447 (2003).
20. Bergstroem, B. *et al.* Identification of a novel *in vivo* virus-targeted phosphorylation site in interferon regulatory factor-3 (IRF3). *J Biol Chem*. **285** (32), 24904-24914 (2010).
21. Takahasi, K. *et al.* Ser386 phosphorylation of transcription factor IRF-3 induces dimerization and association with CBP/p300 without overall conformational change. *Genes Cells*. **15** (8), 901-910 (2010).
22. Noyce, R. S., Collins, S. E., & Mossman, K. L. Differential modification of interferon regulatory factor 3 following virus particle entry. *J Virol*. **83** (9), 4013-4022 (2009).
23. McCoy, C. E., Carpenter, S., Palsson-McDermott, E. M., Gearing, L. J., & O'Neill, L. A. Glucocorticoids inhibit IRF3 phosphorylation in response to Toll-like receptor-3 and -4 by targeting TBK1 activation. *J Biol Chem*. **283** (21), 14277-14285 (2008).
24. Olier, S. *et al.* HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *PLoS Pathog*. **6** (11), e1001177 (2010).
25. Kato, H. *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*. **23** (1), 19-28 (2005).
26. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72** 248-254, (1976).
27. Iwamura, T. *et al.* Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes Cells*. **6** (4), 375-388. (2001).
28. tenOever, B. R., Servant, M. J., Grandvaux, N., Lin, R., & Hiscott, J. Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol*. **76** (8), 3659-3669 (2002).
29. Bibeau-Poirier, A. *et al.* Involvement of the I{kappa}B Kinase (IKK)-Related Kinases Tank-Binding Kinase 1/IKKi and Cullin-Based Ubiquitin Ligases in IFN Regulatory Factor-3 Degradation. *J Immunol*. **177** (8), 5059-5067 (2006).
30. Grandvaux, N. *et al.* Sustained Activation of Interferon Regulatory Factor 3 during Infection by Paramyxoviruses Requires MDA5. *J Innate Immun*. **6** (5), 650-662 (2014).

Lung epithelial NOX/DUOX and respiratory virus infections

Nathalie Grandvaux*†, Mélissa Mariani* and Karin Fink*†

*CRCHUM – Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada, H2X 0A9

†Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Abstract

Determining the role of NADPH oxidases in the context of virus infection is an emerging area of research and our knowledge is still sparse. The expression of various isoforms of NOX/DUOX (NADPH oxidase/dual oxidase) in the epithelial cells (ECs) lining the respiratory tract renders them primary sites from which to orchestrate the host defence against respiratory viruses. Accumulating evidence reveals distinct facets of the involvement of NOX/DUOX in host antiviral and pro-inflammatory responses and in the control of the epithelial barrier integrity, with individual isoforms mediating co-operative, but surprisingly also opposing, functions. Although *in vivo* studies in mice are in line with some of these observations, a complete understanding of the specific functions of epithelial NOX/DUOX awaits lung epithelial-specific conditional knockout mice. The goal of the present review is to summarize our current knowledge of the role of individual NOX/DUOX isoforms expressed in the lung epithelium in the context of respiratory virus infections so as to highlight potential opportunities for therapeutic intervention.

Key words: dual oxidase, infection, NADPH oxidase, lung, respiratory virus

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS), mostly derived from phagocytes recruited to the airway mucosa, are well known to be important culprits in the pathophysiology of various acute and chronic lung inflammatory diseases, including acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, asthma and chronic obstructive pulmonary disease [1,2]. However, it is now also evident that non-phagocytic cells, including airway and alveolar epithelial cells (ECs), express oxidases capable of generating stimulus-induced intermediate levels of ROS, such as superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) [3]. In the past decade, the concept of 'redox biology' has been refined with an improved characterization of the role of sub-toxic levels of ROS as a cellular switch for signalling cascades in various physiological processes, including cell proliferation, apoptosis and immune and pro-inflammatory responses. Similar to the regulation of cellular functions by the well-known phosphorylation/dephosphorylation processes, ROS actions in the regulation of cellular signalling are generally me-

diated by reversible oxidative post-translational modifications within specific target proteins [4]. This novel concept has led to re-evaluation of the role of ROS in the lung and their contribution to physiological responses.

An intensive area of investigation has been the identification of the source of ROS in the lung and the family of NADPH oxidase membrane enzymes has emerged as a major player in this regard. In the late 1980s, the identification of gp91^{phox} {now known as NADPH oxidase 2 (NOX2); reviewed in [5]} as the NADPH oxidase responsible for the respiratory burst observed in professional phagocytic cells (neutrophils, macrophages and eosinophils) resulted from the study of the genetic defect causing chronic granulomatous disease (CGD), which is characterized by the failure to mount an effective innate defence against bacteria and fungi resulting in life-threatening recurrent infections and formation of granulomas. The clinical picture is diverse with multiple organs involved, including gastrointestinal (GI) tract, liver and skin, but the most commonly involved organ is the lung [6,7]. Antibiotic-/antifungal-based prophylactic

Abbreviations: ALI, air-liquid interface; CCL, CC chemokine ligand; CGD, chronic granulomatous disease; CXCL, CXC chemokine ligand; DUOX, dual oxidase; EC, epithelial cell; ENaC, epithelial Na^+ channel; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor; HOI, hypolodous acid; IAV, influenza virus; IFN, interferon; IL, interleukin; IRF, interferon-regulatory factor; ISG, interferon-stimulated gene; LPO, lactoperoxidase; MAVS, mitochondrial antiviral signalling protein; MCR, monocyte chemoattractant protein; MDA5, melanoma-differentiation-associated gene 5; NF- κ B, nuclear factor κ B; NHBE, normal human bronchial epithelial cell; NHNEC, normal human nasal epithelial cell; NOX, NADPH oxidase; OSCN⁻, hypothyocyanate; RIG-I, retinoic acid-inducible gene 1; RLR, RIG-I-like receptor; ROS, reactive oxygen species; RSV, respiratory syncytial virus; RV, rhinovirus; SARS-CoV, severe acute respiratory syndrome coronavirus; SeV, Sendai virus; STAT, signal transducer and activator of transcription; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumour necrosis factor; TNFR, TNF α receptor; sTNFR1, soluble TNFR1; TACE, TNF α -converting enzyme; WT, wild-type.

Table 1 Shared and specific characteristics of NOX/DUOX enzymes

Catalytic subunit	Protein partner	Regulatory components	ROS detected	Molecular features	
				Shared	Specific
NOX1/3	p22phox	NOXA1, NOXO1, Rac	O ₂ ⁻	<ul style="list-style-type: none"> • 6 transmembrane loops • 2 haems • NADPH binding site • FAD binding site 	
NOX2	p22phox	p47phox, p67phox, p40phox, Rac	O ₂ ⁻		
NOX4	p22phox		H ₂ O ₂		
NOX5		Ca ²⁺	O ₂ ⁻		<ul style="list-style-type: none"> • EF-hands
DUOX1	DUOXA1	Ca ²⁺	H ₂ O ₂		<ul style="list-style-type: none"> • Additional transmembrane loop • Extended extracellular domain containing a peroxidase-like domain • EF-hands
DUOX2	DUOXA2	Ca ²⁺	H ₂ O ₂		

treatment has successfully transformed CGD from a disease of early fatality to a manageable disease with a high survival rate [6,7].

The phagocyte NADPH oxidase consists of a membrane flavocytochrome *b₅₅₈* composed of NOX2 and the associated p22^{phox} protein. Stimulus-dependent activation results in the phosphorylation and subsequent Rac-dependent translocation of cytosolic regulatory subunits, p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox}, which associate with the membrane subunits allowing electrons to transfer from NADPH to FAD and ultimately reducing O₂ to generate O₂⁻ [5]. A number of mutations in this complex have been identified as causative for CGD. X-linked CGD results from mutations in the genes encoding NOX2 (*cybb* gene). Less frequent autosomal recessive forms of CGD involve mutations in p22^{phox} (*cyba* gene), p47^{phox} (*NCF1* gene), p67^{phox} (*NCF2* gene) or p40^{phox} (*NCF4* gene) [5,6].

Until the identification of the first NOX2 homologue in 1999, now known as NOX1, the prevailing idea was that NADPH oxidase activity was restricted to professional phagocytes [8]. However, with the discovery of a total of six human homologues of NOX2, NOX1–NOX5 and dual oxidases (DUOX1 and DUOX2), it is now clear that virtually all cell types, including airway and alveolar ECs, express at least one of these isoforms. The NOX family is involved in a large spectrum of functions ranging from host defence, cell growth/death, thyroid hormone synthesis, angiogenesis and blood pressure [3,9]. Although the basic functional principles are similar among the different family members, such that all catalyse the reduction of O₂ by electrons transferred from NADPH, each NOX/DUOX exhibits specific molecular features that define their distinct regulatory mechanisms, their association with regulatory subunits and their oxidant subtype production (summarized in Table 1 and reviewed in details in [10,11]).

Over the past decade, increased characterization of NOX/DUOX enzyme expression and function has revealed that

distinct non-phagocyte isoforms are also involved in host defence. This function is not restricted to bacteria and fungus but also expands to a number of viruses, including the major respiratory viruses influenza virus (IAV), respiratory syncytial virus (RSV) and rhinovirus (RV). In the present paper, we review the current knowledge of the role of NOX/DUOX enzymes expressed in ECs along the respiratory tract in the host defence against respiratory viruses.

EXPRESSION OF NOX/DUOX IN ECs ALONG THE RESPIRATORY TRACT DURING RESPIRATORY VIRUS INFECTION

Multiple NOX/DUOX isoforms are present at basal levels in ECs

H₂O₂ has long been shown to be present in exhaled breath condensate and airway/alveolar secretions and the contribution of ECs to the release of H₂O₂ in the airway/alveolar lumen was shown in *ex vivo* culture of isolated rat alveolar ECs [3,12]. The demonstration that ECs can produce ROS in response to a specific stimulation came later from the observation that the basal rate of H₂O₂ produced by guinea pig tracheal ECs cultured at the air–liquid interface (ALI) can be enhanced following *ex vivo* stimulation with PMA or platelet-activating factor (PAF) [13]. Since then, various studies have demonstrated that ECs along the respiratory tract, including nasal, airways and alveolar epithelium, are capable of producing ROS in response to various cell stimulations [3]. In this regard, the role of NOX/DUOX enzymes has started to attract much attention.

The most prevalent NADPH oxidase transcripts found in ECs in the different sections of the respiratory tract are DUOX1 and DUOX2. DUOX mRNA and protein expression are detected in primary normal human nasal epithelial cells (NHNECs) [14,15],

in ECs isolated from human or mouse trachea and bronchi cultured in submerged conditions or differentiated *ex vivo* by culture in ALI [16–18] and in human type 2 alveolar ECs [19]. Although present at lower levels, transcripts for *NOX1*, *NOX2*, *NOX4* and *NOX5* isoforms are expressed in primary human tracheal ECs [16]. *NOX1* mRNA has been detected in murine type 2 alveolar ECs [20]. The expression of NOX1 protein in murine alveolar ECs was confirmed by immunofluorescence staining of mouse lung sections [21]. In contrast, analysis of type 1 and type 2 alveolar ECs isolated from male Sprague–Dawley rats showed NOX2 protein expression in both cell types, with a substantially higher expression level in type 1 cells, accompanied by the detection of p22^{phox} and the regulatory subunits p47^{phox} and p67^{phox} [22]. Expression of the NOX2 transcripts and protein was also reported in primary normal human bronchial epithelial cells (NHBEs) [23,24]. Further detailed studies will be required to determine whether NOX/DUOX isoforms expression in ECs along the respiratory tract is dependent on cellular subtype and species.

The expression of NOX/DUOX isoforms has also been widely studied in various cell lines including A549 adenocarcinomic human alveolar basal cells, Calu-3 human sub-bronchial serous gland cells, hTE human tracheal ECs, NCI-H292 human pulmonary mucocutaneous carcinoma cells and HBE1 immortalized human bronchial ECs. Although these studies confirmed the overall expression of DUOX1/DUOX2 and of NOX1, NOX2, NOX4 and NOX5, they also highlight significant discrepancies between cell lines that should be taken into account for functional NOX analysis [16,23,25–28].

Inducible expression of DUOX2 during respiratory virus infection

Analysis of NOX/DUOX expression in airway and alveolar ECs subjected to respiratory virus infection provided the first hint of a role for DUOX2 in the host antiviral response. The initial observation that epithelial DUOX2 transcripts were inducible in conditions of viral infection was made in human primary tracheobronchial ECs stimulated with poly (I:C), a mimetic of viral dsRNA widely used to study the response to virus sensing or infected with the non-segmented positive-sense ssRNA picornavirus RV1B [29]. Further studies have demonstrated that DUOX2 expression, at both transcript and protein levels, is also observed in response to non-segmented negative-sense ssRNA paramyxoviruses, Sendai virus (SeV) and RSV in A549 cells, polarized Calu-3 cells and NHBEs [25]. Infection with negative-sense ssRNA orthomyxovirus IAV also induces DUOX2 transcripts and protein levels in polarized NHBEs, to an extent that depends on the strain. Infection with the IAV Texas/36/1991 (H1N1) strain led to a robust increase in DUOX2 expression, whereas IAV Wyoming/3/2003 (H3N2) induced DUOX2 expression to a lower level [24]. In agreement with the now well-characterized bi-directional promoter that concomitantly transcribes *DUOX2* and *DUOX2A2* [30,31], *DUOX2A2* mRNA transcript levels were also induced in response to SeV and IAV [24,25]. In contrast with a clear pattern of DUOX2 induction in the various respiratory virus infections assessed to date, the analysis of DUOX1 expression revealed distinct profiles. Although *DUOX1* mRNA levels were unchanged following poly (I:C) stimulation or infection by RV1B in human

primary tracheobronchial ECs, DUOX1 mRNA and protein expression levels were down-regulated by both IAV Texas/36/1991 (H1N1) and Wyoming/3/2003 (H3N2) IAV strains, with H3N2 virus inducing a more pronounced effect [24,29] (Figure 1).

The observation that DUOX2 induction in response to virus infection is dependent on virus replication [24,25] is consistent with the described induction of DUOX2 by the auto-crine/paracrine action of virus-induced cytokines [24,25]. Secretion of antiviral and pro-inflammatory cytokines is a hallmark of the early innate immune response in ECs that contribute to the early elimination and limit the progression of the infection in the airway mucosa. This cytokine response is initiated by the recognition of RNA moieties that contain highly conserved ‘molecular signatures’ produced upon viral replication by a heterogeneous group of pattern recognition receptors, including the Toll-like receptors (TLRs) and the cytosolic retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) [32,33]. Sensing of ssRNA viruses in airway/alveolar ECs is mainly mediated by RIG-I and melanoma-differentiation-associated gene 5 (MDA5) members of the RLRs family. Upon nucleic-acid sensing, multiple downstream signalling pathways are engaged that ultimately induce the expression of antiviral and pro-inflammatory cytokine and chemokine genes [34,35] (Figure 1). Analysis of the apical and basolateral media of differentiated NHBEs provided a broad profile of the cytokines and chemokines secreted in response to IAV and RSV. The main antiviral cytokines secreted by ECs are type I (α/β) and type III (λ) interferons (IFNs) [36]. Recently, conditional reporter mice that express luciferase exclusively in defined cell types were used to confirm that ECs, together with lung macrophages, are the main source of IFN β in IAV-infected lung *in vivo* [37]. ECs also secrete multiple pro-inflammatory cytokines and chemokines including, but not restricted to, tumour necrosis factor (TNF) α , interleukin (IL)-1 α , CXC chemokine ligand (CXCL) 8 (IL-8), CC chemokine ligand (CCL) 2 [monocyte chemoattractant protein (MCP)-1], CCL3 [macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α], CCL5 [regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted (RANTES)] and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [36]. Molecular analysis revealed that, unlike typical IFN-stimulated genes (ISGs), IFN β is not sufficient to trigger induction of DUOX2 and DUOX2A2 expression in airway/alveolar ECs. Rather, co-stimulation with IFN β and another pro-inflammatory cytokine is required. IFN β and TNF α co-stimulation is known to trigger a delayed antiviral response [38] and it was demonstrated that it induces DUOX2/DUOX2A2 expression in A549 cells and NHBEs (Figure 1) [25]. The signalling cascade engaged downstream of this specific cytokines co-stimulation is still sparsely characterized, but DUOX2 expression was found to be mediated by a non-canonical signal transducer and activator of transcription (STAT) 2- and IFN-regulatory factor (IRF)-9-dependent, but STAT1-independent, pathway that requires tyrosine kinase 2 (Tyk2)-dependent STAT2 phosphorylation [25]. Later studies revealed that IFN β /IL-1 β co-stimulation also triggers significant levels of DUOX2/DUOX2A2 expression in polarized NHBEs, but the pathway responsible for this induction remains unknown [24]. Importantly, silencing of TNF α receptor (TNFR)

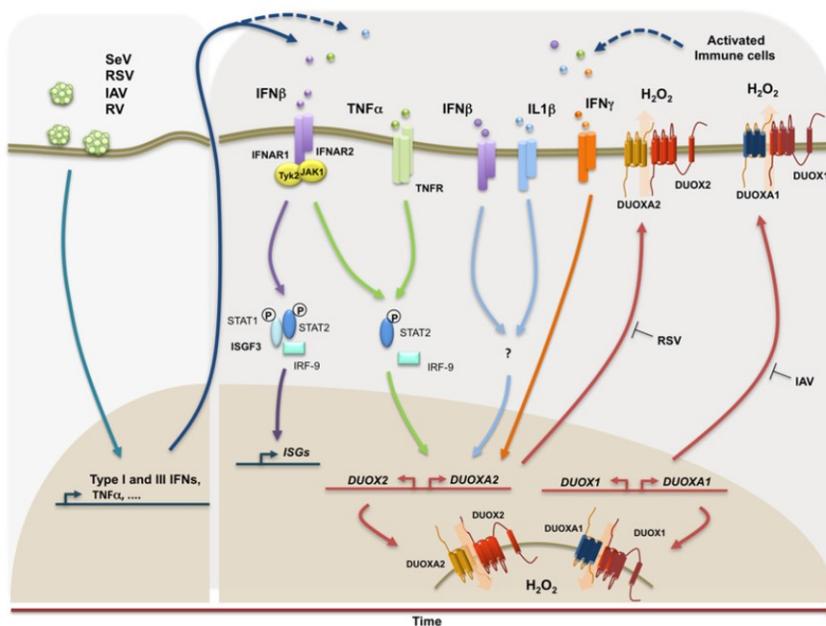


Figure 1 Regulation of DUOX expression during respiratory viral infection in ECs of the respiratory tract
 Infection of ECs by respiratory viruses, such as SeV, RSV, IAV or RV trigger the secretion of antiviral and pro-inflammatory cytokines, including IFN β and TNF α . Binding of IFN β to its cognate receptor activates the classical Janus kinase (JAK)/STAT antiviral pathway mediated by the ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) transcription factor complex that transcribes numerous ISGs encoding proteins with antiviral activities. Additionally, the synergism between IFN β and TNF α induces late DUOX2 and DUOXA2 transcripts (transcribed from the same bi-directional promoter) through a non-canonical STAT1-independent antiviral signalling pathway. The co-stimulation with IFN β and IL-1 β and the stimulation by IFN γ alone also induce DUOX2/DUOXA2 expression by a pathway that remains to be determined. IFN β and TNF α secreted upon viral infection in ECs are sufficient to trigger DUOX2/DUOXA2, but all cytokines responsible for DUOX2/DUOXA2 induction in ECs could also be secreted by immune cells attracted to and activated in the lung following infection. Viruses have evolved multiple mechanisms to counteract the host response. IAV infection was shown to down-regulate DUOX1 levels. Additionally, RSV was shown to interfere with DUOX2 induction. Analysis of DUOX localization in pulmonary ECs revealed that DUOX proteins are located at the apical plasma membrane, but also in nuclear speckles.

or type 1 IFN receptor subunit (IFNAR1) in A549 cells impaired paramyxovirus-induced DUOX2/DUOXA2 expression, thus strongly supporting that IFN β and TNF α derived from infected ECs are responsible for the induction [25]. This shows that the early infection of ECs is sufficient to induce DUOX2/DUOXA2 expression. However, it also supports the possibility that immune cells recruited to the lung while the infection progresses, such as plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and macrophages that produce high levels of IFN β , TNF α and IL-1 β , could further enhance the induction of epithelial DUOX2. Cytokines secreted by immune cells also include IFN γ , which was shown to trigger DUOX2 induction in tracheobronchial ECs [29] (Figure 1).

Consistent with the induced expression of DUOX2/DUOXA2, increased extracellular H₂O₂ release measured using the homovanilic acid (HVA)-based fluorimetric assay, is observed in A549 and polarized NHBEs following virus infection or IFN β /TNF α cytokine co-stimulation [24,25]. Of note, increased intracellular Ca²⁺ concentrations via inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) pump

with thapsigargin was required for the induction of detectable levels of H₂O₂ in polarized NHBEs infected with IAV H1N1 [24]. Whereas siRNA-mediated silencing of DUOX2 in A549 cells demonstrated that DUOX2 was responsible for extracellular H₂O₂ induction upon IFN β /TNF α cytokine co-stimulation [25], contribution of DUOX2 to extracellular H₂O₂ release from IAV H1N1-infected polarized NHBEs remains to be clearly demonstrated. This extracellular release of H₂O₂ in conditions of viral infection is consistent with the observation that DUOX2 and DUOXA2 are present as stable functional complexes detectable at the apical plasma membrane of ECs [3,16,39,40]. In addition to extracellular H₂O₂ release, lentivirus-based shRNA-mediated knockdown of DUOX2 revealed that DUOX2, together with mitochondria, significantly contributes to the intracellular production of H₂O₂ as measured by dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) fluorescence in NHNECs infected with the IAV A/WSN/33 (H1N1) strain [15]. This might reflect DUOX2 localization in intracellular membranes or in IAV H1N1-induced nuclear speckles adjacent to sites of RNA processing [24,40].

ROLE OF EPITHELIAL NOX/DUOX IN THE MUCOSAL HOST IMMUNE DEFENCE

The pseudostratified epithelium lining the respiratory tract is central to the multiple defence mechanisms that protect the airways and alveoli from the continuous exposure to invading pathogens. The epithelium constitutes the very first physical barrier erected against airborne pathogens shielding the host from the infection. Apical cilia of ECs and secreted mucus are responsible for the mucociliary escalator that facilitates mechanical clearance of the pathogens. Importantly, as mentioned above, ECs are equally equipped for detecting pathogens and mounting the earliest elements of the innate arm of host defence via secretion of antimicrobial compounds, including proteins and peptides, and through the secretion of cytokines and chemokines that not only limit viral replication and spreading, but also alarm the immune system of the infection. The distribution of NOX/DUOX in ECs along the respiratory tract has led to the study of their role in the host defence to virus infections. Current results have led to a picture in which DUOX2, NOX2 and NOX1 are involved in the regulation of various aspects of the antiviral response mounted by ECs, as detailed below.

Antiviral functions of DUOX2

The first demonstration of a role for DUOX2-derived ROS in the antiviral host defence came from the observation that silencing of DUOX2 in A549 cells or NHBECS significantly impairs establishment of an efficient antiviral response induced by SeV or by IFN β /TNF α co-stimulation [25]. Additional studies showed that shRNA-mediated knockdown of DUOX2 in NHNECs results in highly increased IAV A/WSN/33 (H1N1) titres [15]. Treatment of polarized NHBECS with the previously recognized NOX1/NOX4 inhibitor GKT136901 was shown to abolish thapsigargin-induced H₂O₂ release, indicative of inhibition of DUOX1/DUOX2 activity. GKT136901 treatment of polarized NHBECS enhanced IAV A/Texas/36/1991 (H1N1) replication [24]. Confirmation of the role of epithelial DUOX isoforms in the antiviral response *in vivo* is biased since mice deficient in DUOX activities suffer from severe hypothyroidism [41]. Moreover, DUOX expression pattern and virus-induced DUOX isoforms up-regulation differ in the lung of mice compared with humans [24]. However, use of intranasal siRNA to knockdown both DUOX1 and DUOX2 in C57BL/6J mice before infection with the pathogenic clinical isolate of 2009 pandemic HH05 (H1N1) IAV yielded increased virus titre compared with control siRNA-treated mice [24]. Taken together with the *in vitro* and *ex vivo* studies described above, this work strongly supports a key role for DUOX2 in the overall airway antiviral defence *in vivo*. Possible mechanisms of DUOX2-dependent antiviral function have been highlighted as outlined below.

The cytokine/chemokine response is a major determinant of the elimination or progression of respiratory virus infections. Antiviral cytokines restrict virus replication, whereas pro-inflammatory cytokines and chemokines contribute to the recruitment and activation of leucocytes in the airway mucosa and thereby orchestrate the development of an appropriate adaptive immune response. This cytokine response is tightly regulated and

evidence supports a role of epithelial DUOX2 in various steps of this regulation. First, analysis of cytokine levels produced by ECs in response to SeV or IAV infection in two independent studies revealed that the role of DUOX2 in restricting virus replication is at least, in part, attributable to the requirement of DUOX2-dependent H₂O₂ production for the sustained production of IFN β and IFN λ [15,25]. However, discrepancies have been reported concerning the underlying mechanism. Indeed, DUOX2 was found to regulate IFN λ at the mRNA level during IAV infection of NHNECs, but IFN β / λ mRNA levels remained steady in A549 cells and NHBECS infected with SeV [15,25] (Figure 2). A second observation supports a role of DUOX2 in the regulation of cytokine production. DUOX2 is required for nuclear factor κ B (NF- κ B) activation and subsequent IL-8 expression, in response to flagellin-induced TLR5 signalling in NHNECs cells. In this same study, challenge of DUOX2 knockout mice with flagellin revealed that DUOX2 influences the expression of various cytokines and chemokines as well as IFN-related genes culminating in a decreased neutrophil infiltration [42]. Although the latter report strongly supports DUOX2-dependent expression of NF- κ B-regulated pro-inflammatory cytokines, this remains to be demonstrated in ECs infected with respiratory viruses. Alternatively, epithelial DUOX2 might also modulate virus-induced inflammation through the regulation of a disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17), also known as TNF α -converting enzyme (TACE). TACE is a membrane-bound enzyme responsible for the shedding of cytokines or their respective receptors, including TNF α , TNFR1 and IL-6 [43]. Stimulation of NCI-H292 ECs and primary human small airway EC (SAECs) using poly (I:C) to engage TLR3 results in the TACE-dependent release of the 34 kDa soluble TNFR1 (sTNFR1) that binds to and sequesters TNF α to modulate its bioactivity [44] (Figure 2). sTNFR1 shedding is mediated via activation of a TLR3-Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN β -related adaptor molecule (TRIF)-RIP1 signalling cascade and is dependent on DUOX2-mediated H₂O₂ production [44]. DUOX1 was also attributed an important role in TACE activation following PMA, human neutrophil elastase or lipopolysaccharide (LPS) stimulation of airway ECs [28,45]. However, the contribution of DUOX1-mediated TACE activation in the context of virus infections remains to be evaluated.

Besides the cytokine response, epithelial DUOX2 might also contribute to the antiviral response through the regulation of the antimicrobial activity in the lumen of the airways. Lactoperoxidase (LPO) secreted in the airway lumen by submucosal glands and surface goblet cells utilizes H₂O₂ and thiocyanate (SCN⁻) to form the bactericidal compound hypothiocyanate (OSCN⁻) [46–48]. DUOX-derived H₂O₂ contributes to this LPO/OSCN⁻ defence mechanism [17,18,49,50]. The importance of DUOX enzymes in this system is also demonstrated by the capacity of *Pseudomonas aeruginosa*, an important aetiological agent in cystic fibrosis, to subvert killing by the LPO/OSCN⁻ system through inhibition of DUOX up-regulation and activity via the virulence factor pyocyanin [51]. Few studies have approached the question of whether this oxidative defence system is also active against respiratory viruses and participates in the antiviral defence of the airways. In a cell-free assay, OSCN⁻ inhibits RSV and the

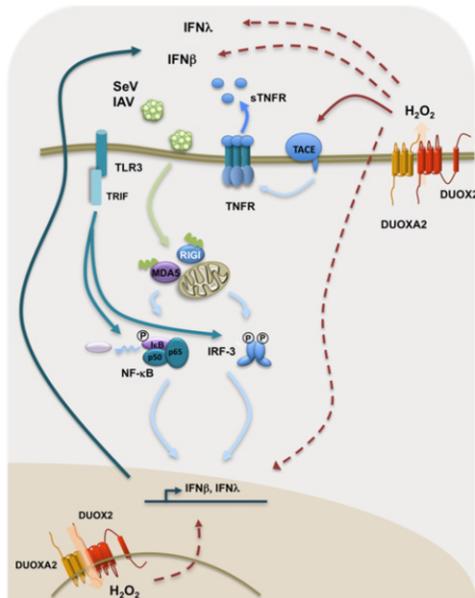


Figure 2 Antiviral functions of DUOX2

Virus- or cytokine-induced DUOX2-dependent H_2O_2 production in ECs is associated with different functions that play a role in the antiviral and pro-inflammatory responses to respiratory virus infections. Viral nucleic acid sensing is ensured by the RIG-I and MDA5 cytosolic receptors and the TLR3 that mediate activation of $NF-\kappa B$ and IRF-3 transcription factors that transcribe genes encoding for antiviral $IFN\beta$ and $IFN\lambda$. First, DUOX2-dependent H_2O_2 is required to sustain the $IFN\beta$ and $IFN\lambda$ levels at the late stage of infection, but it is unclear whether regulation occurs at the mRNA or protein levels. In addition, activation of TLR3 using the viral mimetic poly (I:C) revealed that DUOX2-dependent H_2O_2 positively regulates the activity of the TACE that is involved in the shedding of the TNFR1 to generate sTNFR1 thereby down-regulating the inflammatory response. Solid lines represent reported mechanistic links, whereas dotted lines indicate potential mechanistic links that have not yet been fully demonstrated.

pandemic IAV A/California/2009 (H1N1) strain infectivity [52,53]. Virucidal activity against RSV was found to be pH-dependent, with OSCN⁻ being effective at pH 6, but not at neutral pH [53]. However, a more recent study concluded that hypoidic acid (HOI), an alternative end-product generated by LPO through the use of iodide as a substrate, but not OSCN⁻, possesses antiviral properties against adenovirus or RSV [54]. HOI exhibited significant virucidal activity against adenovirus at pH between 6 and 8, whereas a pH between 6 and 6.5 was required for virucidal activity against RSV. Additionally, supplementation of well-differentiated primary porcine airway ECs with LPO and sodium iodide abrogated infection by adenovirus or RSV [54]. The pH required for effectiveness of this LPO-dependent antiviral activity is consistent with the pH of the airway surface liquid being slightly acidic [55] and in this regard DUOX activity might contribute to H⁺ secretion into the airways and acidifica-

tion of the airway lumen [16]. In conclusion, although the aforementioned studies indicate a potential antiviral role for DUOX2 through an LPO-dependent mechanism, the physiological relevance of this mucosal oxidative antiviral defence remains to be demonstrated.

Epithelial NOX2 is essential for the capacity of ECs to mount an antiviral host defence

The central importance of NOX2 expressed in phagocytes to innate host defence is clearly illustrated in the CGD condition characterized by severe and recurrent bacteria and fungi infections as a result of defective innate defence (reviewed in [5]). Patients with CGD are considered to have a normal immunity against viruses, although susceptibility to severe RSV infection was reported [56]. As described above, expression of NOX2 in ECs along the respiratory tract has only been recently described, but the limited understanding of its function in these cells points to an important role in antiviral defence.

The role of NOX2 in the host defence against respiratory viruses was first reported in the context of IAV infection of NOX2 knockout mice. Two independent studies concluded that the absence of NOX2 increases IAV A/X-31 (H3N2) clearance reduces lung damage and improves lung function, but they diverge regarding the affect of NOX2 on lung inflammation [57,58] (Table 2). In the study by Snelgrove et al. [57], the lack of functional NOX2 in C57BL/6 Cybb tm1 mice [59] paradoxically resulted in an increased inflammatory infiltrate, consisting of macrophages, neutrophils and Th1-skewed T-cells that is restricted to the airways. In contrast, the lung parenchyma inflammatory infiltration was reduced [57]. On the other hand, Vlahos et al. [58] reported that male NOX2^{-/-} C57BL/6 mice infected with IAV exhibit decreased MCP-1 levels and reduced airway inflammation due to decreased infiltration of macrophages. This decrease in macrophages probably contributes to the observed decreased levels of lung peroxynitrite as IAV was shown to enhance NOX2-dependent ROS production in macrophages [60]. Although Snelgrove et al. [57] proposed that decreased virus titre was due to the increased macrophage numbers in the airways of NOX2 Cybb tm1 mice presumably clearing the virus, the study by Vlahos et al. [58] reported a reduction in macrophages in the NOX2^{-/-} lungs, which is thus unlikely to explain the observed reduction in virus titres in this model [57,58]. These divergences could be due to either the different genetic backgrounds of the mice and/or the viral doses used (Table 2). Mice harbouring a mutation in the *NCF1* gene encoding p47^{phox} (B10.Q.Ncf1^{mut/mut}) exhibit highly reduced p47^{phox} expression and undetectable ROS response. These mice exhibit decreased severity of H5N1-mediated acute lung injury, which is associated with an impaired production of oxidized phospholipids that induce cytokine expression through a TLR4-dependent pathway [61] (Table 2). This observation further supports a role for NOX2 in IAV-induced inflammation [61]. A major limitation of the different mouse models used in these studies (Table 2) is that they could not distinguish the function of NOX2 in phagocytic cells compared with ECs. Assessing this aspect *in vivo* is awaiting lung epithelial-specific NOX2 knockout models. Meanwhile, *in vitro* and *ex vivo* infections of A549 cells and NHBECS has

Table 2 Phenotype of mice deficient in NOX activity subjected to IAV infection

Mouse model	Cybb ^{tm1} (X-CGD) NOX2 ^{-/-} C57BL/6	Male NOX2 ^{-/-} C57BL/6	B10.Q.Ncf1 ^{mut/mut} (p47phox ^{-/-})	Male NOX1 ^{-/-} C57BL/6
IAV strain - dose	A X31 (H3N2) – 50 HAU	A X31 (H3N2) – 10 ⁴ pfu	A/ck/Yamaguchi 7/04 H5N1	A X31 (H3N2) – 10 ⁴ pfu
Phenotype	<ul style="list-style-type: none"> Improved lung function Decreased lung damage 			<ul style="list-style-type: none"> Increased GM-CSF, CCL2, CCL3, CXCL2, TNFα, IL-1β and IL-6 at day 3 post-infection Enhanced neutrophilia at day 3 post-infection Greater peribronchial inflammation and alveolitis Increased lung oxidative stress
	<ul style="list-style-type: none"> Increased viral clearance 			
	<ul style="list-style-type: none"> Increased airway inflammatory infiltrate (neutrophils, macrophages, Th1-T lymphocytes) Decreased lung parenchyma infiltration Increased TNFα, IL-6, MCP-1, IL-12 	<ul style="list-style-type: none"> Decreased inflammatory bronchial, peribronchial, airways infiltrate (macrophages) Decreased MCP-1 Increased IL-1β Decreased lung peroxynitrite Decreased alveolar cells apoptosis 	<ul style="list-style-type: none"> Decreased lung oedema Decreased oxidized phospholipids 	
References	[57]	[58]	[61]	[21]

started to decipher the specific involvement of epithelial NOX2 in response to virus infection. That silencing of NOX2 in A549 cells yielded an increase in SeV replication underlines the importance of NOX2 in the capacity of ECs to mount an antiviral response [62]. Further mechanistic analysis unveiled a central role of basal NOX2 activity in the potent mRNA and protein expression of the central adaptor MAVS (mitochondrial antiviral signalling protein) that mediates the innate immune response downstream of RIG-I [62]. Thereby, NOX2 regulates SeV- and RSV-dependent inhibitor of NF- κ B kinase β (IKK β) and TNF-associated factor-associated NF- κ B activator-binding kinase 1 (TBK1) kinase activities acting upstream of NF- κ B and IRF-3 for pro-inflammatory and antiviral cytokines TNF α , CCL5 and IFN β expression [23,62,63] (Figure 3). Although NOX2 was mainly detected in the cytoplasmic fraction of NHBECS [24], NOX2 was also found located at the luminal surface of alveolar, mainly type 1, ECs [22]. Extracellular O₂^{•-} release was found to be essential for basal and epidermal growth factor (EGF)-induced epithelial Na⁺ channel (ENaC) activity [22,64]. ENaC ensures Na⁺ absorption in the airways and is thereby critical for controlling fluid homeostasis for proper luminal space moisture essential for the efficient protection of the airway mucosa [65]. Several viruses, RSV, IAV and severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), inhibit ENaC function thus leading to reduced alveolar fluid clearance contributing to lung oedema formation [66–68]. Whether this is related to an

affect of these viruses on epithelial NOX2 activity remains to be determined.

Role of epithelial NOX1 in the pro-inflammatory response to virus infection

The role of NOX1 in the host response to virus infection has been evaluated *in vivo* using NOX1^{-/-} mice [21]. Infection of NOX1^{-/-} mice with X-31 IAV strain resulted in a transient increase in the lung pro-inflammatory cytokines GM-CSF, CCL2, CCL3, CXCL2, TNF α , IL-1 β and IL-6 mRNA expression at an early stage (day 3) of the infection compared with wild-type (WT) mice. By contrast, at a later stage of infection (day 7), the levels of CCL2, CCL3, CXCL2, IFN γ and IL-10 were significantly lower in NOX1^{-/-} mice compared with WT control, whereas IL-1 β , IL-6, TNF α and GM-CSF were comparable. The transient increase in pro-inflammatory cytokines expression at day 3 was associated with enhanced neutrophilia. Moreover, IAV-infected NOX1^{-/-} mice exhibited greater peribronchial inflammation and alveolitis at both day 3 and day 7. However, the viral titre was similar to WT and NOX1^{-/-} mice [21]. Although this study provides evidence of a protective role of NOX1 toward virus-induced inflammation in the early phase of infection, a direct link between NOX1-derived ROS and this phenotype cannot be fully concluded. Indeed, an unexpected increase in lung oxidative stress, together with NOX2-dependent inflammatory cell ROS production, was observed in IAV infected NOX1^{-/-} mice compared with

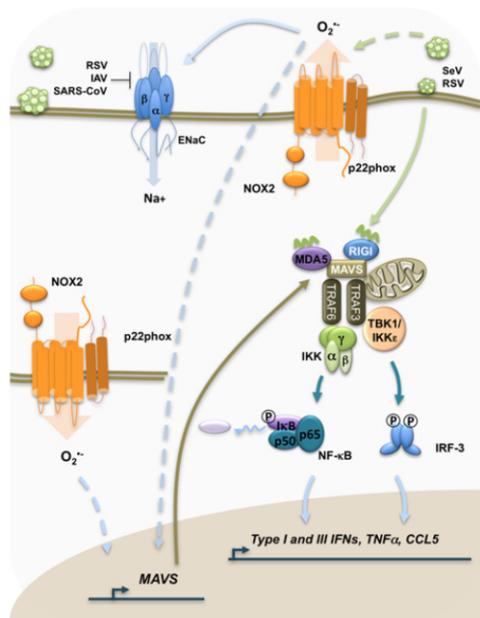


Figure 3 Function of NOX2 in ECs in relation to respiratory virus infections

Basal NOX2-dependent $O_2^{\bullet-}$ production is essential to regulate the expression of the MAVS, a central adaptor that co-ordinates the innate immune response downstream of nucleic acid sensing by the RIG-I and MDA5 cytosolic pattern recognition receptors. Thus, NOX2-dependent regulation of MAVS expression is essential to trigger the activation of NF- κ B and IRF-3 transcription factors that translocate to the nucleus to transcribe genes encoding antiviral and pro-inflammatory cytokines. Furthermore, NOX2 basal activity is also required for the activation of the ENaC, which plays an important role in controlling fluid homeostasis in the lung. If and how viruses regulate NOX2 activity remains to be determined. However, viruses, including RSV, IAV and SARS-CoV, have been shown to inhibit ENaC function thereby contributing to lung oedema formation. Whether this is related to NOX2 activity modulation remains unknown. Analysis of NOX2 localization in pulmonary ECs revealed that NOX2 is present either at the apical plasma membrane or in yet to be identified cytoplasmic membranes. Solid lines represent reported mechanistic links, whereas dotted lines indicate potential mechanistic links that have not yet been fully demonstrated.

WT mice [21]. NOX1 is expressed in the lung epithelium, but is also detected in endothelial cells [20,21]. Although the specific contribution of epithelial NOX1 in the phenotype observed *in vivo* was not evaluated, the central role of ECs in the secretion of pro-inflammatory cytokines during IAV infection [37] strongly supports a major role of epithelial NOX1 in the modulation of the early cytokine wave that is increased in NOX^{-/-} mice. A major transcription factor involved in the expression of pro-inflammatory cytokines is NF- κ B. However, analysis of SeV-induced NF- κ B-dependent promoter activation in A549 cells following knockdown of NOX1 by RNA interference failed to establish a link between NOX1 and NF- κ B activation [23].

ROLE OF NOX/DUOX IN EPITHELIAL BARRIER INTEGRITY

In the respiratory mucosa, the intimate EC layer integrity and permeability are ensured by cell–cell junctions, including tight junctions and adherens junctions, which provide strong adhesion to form a physical barrier against invading pathogens while preserving communication between neighbouring cells. Respiratory viral infections can injure the epithelium through cytotoxic effects, disruption of tight junctions or interference with epithelial repair, causing a loss of integrity and protection that can be detrimental for the host [34].

Epithelial DUOX1 has a major implication in the process of wound healing. DUOX1-derived H_2O_2 is critical for wound closure in human NCI-H292 and HBE1 cell lines and murine tracheal ECs *in vitro* through the activation of the known mediator of EC migration and wound responses epidermal growth factor receptor (EGFR) [26,69–71]. DUOX1 is also critical for epithelium regeneration *in vivo* in a murine model of epithelial injury induced by naphthalene [70]. Interestingly, a study conducted in a zebrafish model links DUOX-generated H_2O_2 production at the site of the wound to leucocyte recruitment, a necessary event for wound repair. Wounded epithelium might thus use DUOX-derived H_2O_2 not only to activate its own repair programme, but also as a second messenger for communication with the haematopoietic compartment further contributing to the repair mechanisms [72]. Although the role of DUOX1 in epithelium repair has not been directly studied in the context of respiratory virus infections, the observation that IAV inhibits DUOX1 expression suggests that this could be a factor contributing to IAV-induced epithelium injury [24] (Figure 2).

In contrast with the positive contribution of epithelial DUOX1 to the airway epithelium integrity, NOX1 has an adverse effect on epithelial barrier function. RV and poly (I:C) were shown to mediate disruption of the epithelial barrier function through dissociation of the tight junctions in polarized cultures of 16HBE140⁻ cells [73]. This virus-induced barrier disruption was blocked by inhibitors of NOX activity, such as the Rac1 inhibitor NSC23766 or the generic flavoprotein inhibitor diphenyleneiodonium. Similar results were obtained following interference with NOX1 expression suggesting a key role of NOX1 in this process [73]. Importantly, NOX1-dependent barrier disruption facilitates bacterial transmigration across polarized airway ECs, a major event in the susceptibility to bacterial infections secondary to virus infection [73].

CONCLUSIONS

The role of NOX/DUOX-derived ROS in the host response to respiratory virus infections is an exciting emerging area of research that has a strong potential to unveil opportunities for therapeutic intervention. Improved therapeutic strategies are required for most respiratory viruses for which universal vaccine is not available or development of resistance to antiviral is a concern. Major advances have been made over the past decade that

dramatically increased our knowledge with regards to the specific functions of each NOX/DUOX during respiratory virus infections. From the recent evidence, a multi-faceted picture is emerging in which individual isoforms mediate co-operative, but surprisingly, also opposing roles in the regulation of the antiviral and pro-inflammatory responses and in the control of the epithelial barrier integrity. A key challenge will be to fully determine the cell-specific role of each NOX/DUOX isoforms *in vivo*. Various isoforms are expressed in the ECs lining the respiratory tract, which renders them primary sites from which to orchestrate the host defence against respiratory viruses. Although animal models do not faithfully reflect every mechanisms occurring in humans, the field would highly benefit from the generation of lung epithelial-specific conditional knockout mice.

The current observations have already built the case for the inefficacy of global antioxidant strategies or generic approaches that interfere with the overall ROS production. Indeed these strategies would inhibit both detrimental and protective ROS-dependent effects. Development of more refined strategies based on the selective targeting of NOX/DUOX (reviewed in [74,75]) to control specific aspects of the host response to virus infection are needed. However, even if the specific targeting of NOX/DUOX is achieved, such a strategy would have to be finely tuned to target the harmful response, such as excessive pro-inflammatory response, while sparing or enhancing the beneficial actions, such as antiviral defence and protection of epithelium integrity. Given the importance of ROS in a number of acute and chronic lung diseases such as acute lung injury, asthma and chronic obstructive pulmonary disease that are all exacerbated by virus infections, a therapeutic strategy aimed at targeting specific NOX/DUOX may prove efficient in a broad range of human respiratory health conditions. However, the current knowledge of the role of NOX/DUOX in the host defence against respiratory virus infections strongly suggest that the patients under such therapy will need to be evaluated to ensure that they retain a sufficient capacity to mount a protective innate antiviral defence.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr C. Vande Velde (CRCHUM, Montréal) for critical reading of the manuscript before submission.

FUNDING

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) [grant number MOP-130527]; and the Institute of Infection and Immunity (III) of the CIHR [grant number III-134054 (to N.G.)]. N.G. is a recipient of a Tier II Canada Research Chair.

REFERENCES

- MacNee, W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* **429**, 195–207 [CrossRef PubMed](#)
- Chow, C. W., Herrera Abreu, M. T., Suzuki, T. and Downey, G. P. (2003) Oxidative stress and acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 427–431 [CrossRef PubMed](#)
- Fischer, H. (2009) Mechanisms and function of DUOX in epithelia of the lung. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2453–2465 [CrossRef PubMed](#)
- Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 [PubMed](#)
- Vignais, P. V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 1428–1459 [CrossRef PubMed](#)
- Mahdavi, S. A., Mohajerani, S. A., Rezaei, N., Casanova, J. L., Mansouri, S. D. and Velayati, A. A. (2013) Pulmonary manifestations of chronic granulomatous disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **9**, 153–160 [CrossRef PubMed](#)
- Holland, S. M. (2013) Chronic granulomatous disease. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **27**, 89–99 [CrossRef PubMed](#)
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K. and Lambeth, J. D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**, 79–82 [CrossRef PubMed](#)
- Lambeth, J. D. and Neish, A. S. (2014) Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 119–145 [CrossRef PubMed](#)
- Nauseef, W. M. (2014) Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 757–767 [CrossRef PubMed](#)
- Sumimoto, H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* **275**, 3249–3277 [CrossRef PubMed](#)
- Kinnula, V. L., Everitt, J. I., Whorton, A. R. and Crapo, J. D. (1991) Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **261**, L84–L91 [PubMed](#)
- Kinnula, V. L., Adler, K. B., Ackley, N. J. and Crapo, J. D. (1992) Release of reactive oxygen species by guinea pig tracheal epithelial cells *in vitro*. *Am. J. Physiol.* **262**, L708–L712 [PubMed](#)
- Cho, D. Y., Nayak, J. V., Bravo, D. T., Le, W., Nguyen, A., Edward, J. A., Hwang, P. H., Illek, B. and Fischer, H. (2013) Expression of dual oxidases and secreted cytokines in chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **3**, 376–383 [CrossRef PubMed](#)
- Kim, H. J., Kim, C. H., Ryu, J. H., Kim, M. J., Park, C. Y., Lee, J. M., Holtzman, M. J. and Yoon, J. H. (2013) Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN- λ regulation in human nasal epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **49**, 855–865 [CrossRef PubMed](#)
- Schwarzer, C., Machen, T. E., Illek, B. and Fischer, H. (2004) NADPH Oxidase-dependent Acid Production in Airway Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 36454–36461 [CrossRef PubMed](#)
- Forteza, R., Salathe, M., Miot, F., Forteza, R. and Conner, G. E. (2005) Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 462–469 [CrossRef PubMed](#)
- Geiszt, M., Witta, J., Baffi, J., Lekstrom, K. and Leto, T. L. (2003) Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J.* **17**, 1502–1504 [PubMed](#)
- Fischer, H., Gonzales, L. K., Kolla, V., Schwarzer, C., Miot, F., Illek, B. and Ballard, P. L. (2007) Developmental regulation of DUOX1 expression and function in human fetal lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **292**, L1506–L1514 [CrossRef PubMed](#)
- Carnesecchi, S., Deffert, C., Pagano, A., Garrido-Urbani, S., Métrailler-Ruchonnet, I., Schäppi, M., Donati, Y., Matthay, M. A., Krause, K. H. and Barazzone Argiroffo, C. (2009) NADPH oxidase-1 plays a crucial role in hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 972–981 [CrossRef PubMed](#)
- Selemidis, S., Seow, H. J., Broughton, B. R., Vinh, A., Bozinovski, S., Sobey, C. G., Drummond, G. R. and Vlahos, R. (2013) Nox1 oxidase suppresses influenza a virus-induced lung inflammation and oxidative stress. *PLoS ONE* **8**, e60792 [CrossRef PubMed](#)

- 22 Takemura, Y., Goodson, P., Bao, H. F., Jain, L. and Helms, M. N. (2010) Rac1-mediated NADPH oxidase release of O₂⁻ regulates epithelial sodium channel activity in the alveolar epithelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **298**, L509–L520 [CrossRef PubMed](#)
- 23 Fink, K., Duval, A., Martel, A., Soucy-Faulkner, A. and Grandvaux, N. (2008) Dual role of NOX2 in respiratory syncytial virus- and sendai virus-induced activation of NF-kappaB in airway epithelial cells. *J. Immunol.* **180**, 6911–6922 [CrossRef PubMed](#)
- 24 Strengert, M., Jennings, R., Davanture, S., Hayes, P., Gabriel, G. and Knaus, U. G. (2013) Mucosal reactive oxygen species are required for antiviral response: role of duox in influenza A virus infection. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2695–2709 [CrossRef PubMed](#)
- 25 Fink, K., Martin, L., Mukawera, E., Chartier, S., De Deken, X., Brochiero, E., Miot, F. and Grandvaux, N. (2013) IFN β /TNF α synergism induces a non-canonical STAT2/IRF9-dependent pathway triggering a novel DUOX2 NADPH oxidase-mediated airway antiviral response. *Cell Res.* **23**, 673–690 [CrossRef PubMed](#)
- 26 Wesley, U. V., Bove, P. F., Hristova, M., McCarthy, S. and van der Vliet, A. (2007) Airway epithelial cell migration and wound repair by ATP-mediated activation of dual oxidase 1. *J. Biol. Chem.* **282**, 3213–3220 [CrossRef PubMed](#)
- 27 Nakanaga, T., Nadel, J. A., Ueki, I. F., Koff, J. L. and Shao, M. X. (2007) Regulation of interleukin-8 via an airway epithelial signaling cascade. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **292**, L1289–L1296 [CrossRef PubMed](#)
- 28 Boots, A. W., Hristova, M., Kasahara, D. I., Haenen, G. R., Bast, A. and van der Vliet, A. (2009) ATP-mediated activation of the NADPH oxidase DUOX1 mediates airway epithelial responses to bacterial stimuli. *J. Biol. Chem.* **284**, 17858–17867 [CrossRef PubMed](#)
- 29 Harper, R. W., Xu, C., Eiserich, J. P., Chen, Y., Kao, C. Y., Thai, P., Setiadi, H. and Wu, R. (2005) Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Lett.* **579**, 4911–4917 [CrossRef PubMed](#)
- 30 Grasberger, H. and Refetoff, S. (2006) Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J. Biol. Chem.* **281**, 18269–182672 [CrossRef PubMed](#)
- 31 Christophe-Hobertus, C. and Christophe, D. (2010) Delimitation and functional characterization of the bidirectional THOX-DUOXA promoter regions in thyrocytes. *Mol. Cell Endocrinol.* **317**, 161–167 [CrossRef PubMed](#)
- 32 Takeuchi, O. and Akira, S. (2009) Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* **227**, 75–86 [CrossRef PubMed](#)
- 33 Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 [CrossRef PubMed](#)
- 34 Varelle, M., Kieninger, E., Edwards, M. R. and Regamey, N. (2011) The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 210–229 [CrossRef PubMed](#)
- 35 Marr, N., Turvey, S. E. and Grandvaux, N. (2013) Pathogen recognition receptor crosstalk in respiratory syncytial virus sensing: a host and cell type perspective. *Trends Microbiol.* **21**, 568–574 [CrossRef PubMed](#)
- 36 Ioannidis, I., McNally, B., Willette, M., Peeples, M. E., Chaussabel, D., Durbin, J. E., Ramilo, O., Mejias, A. and Flaño, E. (2012) Plasticity and virus specificity of the airway epithelial cell immune response during respiratory virus infection. *J. Virol.* **86**, 5422–5436 [CrossRef PubMed](#)
- 37 Kallfass, C., Lienenklaus, S., Weiss, S. and Staeheli, P. (2013) Visualizing the beta interferon response in mice during infection with influenza A viruses expressing or lacking nonstructural protein 1. *J. Virol.* **87**, 6925–6930 [CrossRef PubMed](#)
- 38 Bartee, E., Mohamed, M. R., Lopez, M. C., Baker, H. V. and McFadden, G. (2009) The addition of tumor necrosis factor plus beta interferon induces a novel synergistic antiviral state against poxviruses in primary human fibroblasts. *J. Virol.* **83**, 498–511 [CrossRef PubMed](#)
- 39 Morand, S., Ueyama, T., Tsujibe, S., Saito, N., Korzeniowska, A. and Leto, T. L. (2009) Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. *FASEB J.* **23**, 1205–1218 [CrossRef PubMed](#)
- 40 Luxen, S., Noack, D., Frausto, M., Davanture, S., Torbett, B. E. and Knaus, U. G. (2009) Heterodimerization controls localization of Duox-DuoxA NADPH oxidases in airway cells. *J. Cell Sci.* **122**, 1238–1247 [CrossRef PubMed](#)
- 41 Grasberger, H., De Deken, X., Mayo, O. B., Raad, H., Weiss, M., Liao, X. H. and Refetoff, S. (2012) Mice deficient in dual oxidase maturation factors are severely hypothyroid. *Mol. Endocrinol.* **26**, 481–492 [CrossRef PubMed](#)
- 42 Joo, J. H., Ryu, J. H., Kim, C. H., Kim, H. J., Suh, M. S., Kim, J. O., Chung, S. Y., Lee, S. N., Kim, H. M., Bae, Y. S. and Yoon, J. H. (2012) Dual oxidase 2 is essential for the toll-like receptor 5-mediated inflammatory response in airway mucosa. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 57–70 [CrossRef PubMed](#)
- 43 Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C. and Rose-John, S. (2011) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* **32**, 380–387 [CrossRef PubMed](#)
- 44 Yu, M., Lam, J., Rada, B., Leto, T. L. and Levine, S. J. (2011) Double-stranded RNA induces shedding of the 34-kDa soluble TNFR1 from human airway epithelial cells via TLR3-TRIF-RIP1-dependent signaling: roles for dual oxidase 2- and caspase-dependent pathways. *J. Immunol.* **186**, 1180–1188 [CrossRef PubMed](#)
- 45 Shao, M. X. and Nadel, J. A. (2005) Dual oxidase 1-dependent MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 767–772 [CrossRef PubMed](#)
- 46 Gerson, C., Sabater, J., Scuri, M., Torbati, A., Coffey, R., Abraham, J. W., Laurodo, I., Forteza, R., Wanner, A., Salathe, M. et al. (2000) The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 665–671 [CrossRef PubMed](#)
- 47 Wijkstrom-Frel, C., El-Chemaly, S., Ali-Rachedi, R., Gerson, C., Cobas, M. A., Forteza, R., Salathe, M. and Conner, G. E. (2003) Lactoperoxidase and human airway host defense. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 206–212 [CrossRef PubMed](#)
- 48 Conner, G. E., Salathe, M. and Forteza, R. (2002) Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, S57–S61 [CrossRef PubMed](#)
- 49 Gattas, M. V., Forteza, R., Fragoso, M. A., Fregien, N., Salas, P., Salathe, M. and Conner, G. E. (2009) Oxidative epithelial host defense is regulated by infectious and inflammatory stimuli. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1450–1458 [CrossRef PubMed](#)
- 50 Moskwa, P., Lorentzen, D., Excoffon, K. J., Zabner, J., McCray, P. B. Jr., Nauseef, W. M., Dupuy, C. and Bánfi, B. (2007) A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **175**, 174–183 [CrossRef PubMed](#)
- 51 Rada, B., Lekstrom, K., Damian, S., Dupuy, C. and Leto, T. L. (2008) The Pseudomonas toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *J. Immunol.* **181**, 4883–4893 [CrossRef PubMed](#)
- 52 Cegolon, L., Salata, C., Piccoli, E., Juarez, V., Palu', G., Mastrangelo, G. and Calistri, A. (2014) *In vitro* antiviral activity of hypothiocyanite against A/H1N1/2009 pandemic influenza virus. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **217**, 17–22 [CrossRef PubMed](#)
- 53 Mikola, H., Waris, M. and Tenovuo, J. (1995) Inhibition of herpes simplex virus type 1, respiratory syncytial virus and echovirus type 11 by peroxidase-generated hypothiocyanite. *Antiviral Res.* **26**, 161–171 [CrossRef PubMed](#)

- 54 Fischer, A. J., Lennemann, N. J., Krishnamurthy, S., Pócsa, P., Durairaj, L., Launspach, J. L., Rhein, B. A., Wohlford-Lenane, C., Lorentzen, D., Bánfi, B. and McCray, Jr, P. B. (2011) Enhancement of respiratory mucosal antiviral defenses by the oxidation of iodide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 874–881 [CrossRef PubMed](#)
- 55 Jayaraman, S., Song, Y. and Verkman, A. S. (2001) Airway surface liquid pH in well-differentiated airway epithelial cell cultures and mouse trachea. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C1504–C1511 [PubMed](#)
- 56 Uzel, G., Premkumar, A., Malech, H. L. and Holland, S. M. (2000) Respiratory syncytial virus infection in patients with phagocyte defects. *Pediatrics* **106**, 835–837 [CrossRef PubMed](#)
- 57 Snelgrove, R. J., Edwards, L., Rae, A. J. and Hussell, T. (2006) An absence of reactive oxygen species improves the resolution of lung influenza infection. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1364–1373 [CrossRef PubMed](#)
- 58 Vlahos, R., Stambas, J., Bozinovski, S., Broughton, B. R., Drummond, G. R. and Selemidis, S. (2011) Inhibition of Nox2 oxidase activity ameliorates influenza A virus-induced lung inflammation. *PLoS Pathog.* **7**, e1001271 [CrossRef PubMed](#)
- 59 Pollock, J. D., Williams, D. A., Gifford, M. A., Li, L. L., Du, X., Fisherman, J., Orkin, S. H., Doerschuk, C. M. and Dinauer, M. C. (1995) Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat. Genet.* **9**, 202–209 [CrossRef PubMed](#)
- 60 To, E. E., Broughton, B. R., Hendricks, K. S., Vlahos, R. and Selemidis, S. (2014) Influenza A virus and TLR7 activation potentiate NOX2 oxidase-dependent ROS production in macrophages. *Free Radic. Res.* **48**, 940–907 [CrossRef PubMed](#)
- 61 Imai, Y., Kuba, K., Neely, G. G., Yaghubian-Malhami, R., Perkmann, T., van Loo, G., Ermolaeva, M., Veldhuizen, R., Leung, Y. H., Wang, H. et al. (2008) Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* **133**, 235–249 [CrossRef PubMed](#)
- 62 Soucy-Faulkner, A., Mukawera, E., Fink, K., Martel, A., Jouan, L., Nzengue, Y., Lamarre, D., Vande Velde, C. and Grandvaux, N. (2010) Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression. *PLoS Pathog.* **6**, e1000930 [CrossRef PubMed](#)
- 63 Yoboua, F., Martel, A., Duval, A., Mukawera, E. and Grandvaux, N. (2010) Respiratory syncytial virus-mediated NF-kappa B p65 phosphorylation at serine 536 is dependent on RIG-I, TRAF6, and IKK beta. *J. Virol.* **84**, 7267–7277 [CrossRef PubMed](#)
- 64 Goodson, R., Kumar, A., Jain, L., Kundu, K., Murthy, N., Koval, M. and Helms, M. N. (2012) NADPH oxidase regulates alveolar epithelial sodium channel activity and lung fluid balance *in vivo* via O₂⁻ signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **302**, L410–L419 [CrossRef PubMed](#)
- 65 Eaton, D. C., Helms, M. N., Koval, M., Bao, H. F. and Jain, L. (2009) The contribution of epithelial sodium channels to alveolar function in health and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 403–423 [CrossRef PubMed](#)
- 66 Song, W., Liu, G., Bosworth, C. A., Walker, J. R., Megaw, G. A., Lazrak, A., Abraham, E., Sullender, W. M. and Matalon, S. (2009) Respiratory syncytial virus inhibits lung epithelial Na⁺ channels by up-regulating inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **284**, 7294–7306 [CrossRef PubMed](#)
- 67 Ji, H. L., Song, W., Gao, Z., Su, X. F., Nie, H. G., Jiang, Y., Peng, J. B., He, Y. X., Liao, Y., Zhou, Y. J., Tousson, A. and Matalon, S. (2009) SARS-CoV proteins decrease levels and activity of human ENaC via activation of distinct PKC isoforms. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **296**, L372–L383 [CrossRef PubMed](#)
- 68 Chen, X. J., Seth, S., Yue, G., Kamat, P., Compans, R. W., Guidot, D., Brown, L. A., Eaton, D. C. and Jain, L. (2004) Influenza virus inhibits ENaC and lung fluid clearance. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, L366–L373 [CrossRef PubMed](#)
- 69 Koff, J. L., Shao, M. X., Kim, S., Ueki, I. F. and Nadel, J. A. (2006) Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. *J. Immunol.* **177**, 8693–8700 [CrossRef PubMed](#)
- 70 Gorissen, S. H., Hristova, M., Habibovic, A., Sipsey, L. M., Spiess, P. C., Janssen-Heininger, Y. M. and van der Vliet, A. (2013) Dual oxidase-1 is required for airway epithelial cell migration and bronchiolar reepithelialization after injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **48**, 337–345 [CrossRef PubMed](#)
- 71 Sham, D., Wesley, U. V., Hristova, M. and van der Vliet, A. (2013) ATP-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor in airway epithelial cells involves DUOX1-dependent oxidation of Src and ADAM17. *PLoS ONE* **8**, e54391 [CrossRef PubMed](#)
- 72 Razzell, W., Evans, I. R., Martin, P. and Wood, W. (2013) Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Curr. Biol.* **23**, 424–429 [CrossRef PubMed](#)
- 73 Comstock, A. T., Ganesan, S., Chatteraj, A., Faris, A. N., Margolis, B. L., Hershenson, M. B. and Sajjan, U. S. (2011) Rhinovirus-induced barrier dysfunction in polarized airway epithelial cells is mediated by NADPH oxidase 1. *J. Virol.* **85**, 6795–808 [CrossRef PubMed](#)
- 74 Cifuentes-Pagano, E., Meijles, D. N. and Pagano, P. J. (2014) The quest for selective NOX inhibitors and therapeutics: challenges, triumphs and pitfalls. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2741–2754 [CrossRef PubMed](#)
- 75 Vlahos, R., Stambas, J. and Selemidis, S. (2012) Suppressing production of reactive oxygen species (ROS) for influenza A virus therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 3–8 [CrossRef PubMed](#)

Received 23 May 2014/6 October 2014; accepted 7 October 2014

Published on the Internet 28 November 2014, doi: 10.1042/CS20140321