

Université de Montréal

**Étude du rôle de la phosphatase DUSP1 dans la régulation  
de la réponse immunitaire innée autonome dans les cellules  
épithéliales pulmonaires lors de l'infection par le virus  
respiratoire syncytial et le virus Sendai**

par Alexa Robitaille

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Biochimie

Août, 2017

© Alexa Robitaille, 2017



## Résumé

**Introduction:** Une des causes majeures de décès dans le monde est les maladies infectieuses des voies respiratoires inférieures, notamment causées par des virus tels que le virus respiratoire syncytial (RSV). Pour défendre l'hôte, les cellules produisent une réponse antivirale autonome dépendant principalement des interférons de type I/III pour limiter la réplication virale et sécrètent des cytokines/chimiokines proinflammatoires pour orchestrer la réponse immunitaire. Afin d'éviter les dommages tissulaires causés par la production excessive de cytokines, ces réponses doivent être strictement régulées. Les activateurs clés de la défense de l'hôte contre les virus respiratoires sont activés par de multiples événements de phosphorylation, faisant des phosphatases des régulateurs négatifs importants.

**Résultats:** Dans ce mémoire, nous étudions la « dual-specificity phosphatase 1 » (DUSP1) et son implication dans la régulation négative de la réponse de l'hôte induite par RSV et le virus Sendai (SeV). Nous avons constaté que DUSP1 est induit précocement dans l'infection par RSV et SeV dans les cellules A549 et que sa dégradation est dépendante du protéasome. Nous avons également observé que DUSP1 régule négativement l'activation des MAPK JNK et p38 pendant l'infection SeV et RSV. De manière intéressante, nous montrons que l'activation d'AP-1 et la production de cytokines subséquente ne sont pas modulées par DUSP1, étant potentiellement protégées par l'interaction JIP1-JNK. Finalement, nous démontrons pour la première fois que DUSP1 favorise l'apoptose et bloque la migration cellulaire.

**Conclusion et importance:** Nos données suggèrent que DUSP1 agit comme un régulateur négatif de la réparation tissulaire pendant l'infection par RSV et SeV, faisant de lui une cible thérapeutique potentielle intéressante.

**Mots-clés :** DUSP1, JIP1, JNK, p38, migration, apoptose, virus respiratoire syncytial, cytokines, Paramyxovirus, Pneumovirus.

## Abstract

**Introduction:** One of the major causes of death worldwide are the lower respiratory infections, particularly those caused by viruses like the respiratory syncytial virus (RSV). To defend the host, cells produce an autonomous antiviral response that is mostly dependent on type I/III interferons to limit viral replication. They also secrete proinflammatory cytokines/chemokines to orchestrate the immune response. In order to avoid tissue damage caused by an excessive cytokine production, these responses have to be strictly regulated. Key activators of the host's defense against respiratory viruses are activated by multiple phosphorylation events, making phosphatases important negative regulators.

**Results:** In this Master's thesis, we study the dual-specificity phosphatase 1 (DUSP1) and its implication in the negative regulation of the host's response induced by RSV and Sendai virus (SeV). We found that DUSP1 is induced in early RSV and SeV infections in A549 cells and is subjected to proteasomal degradation. We also show that DUSP1 negatively regulates the activation of JNK and p38 MAPKs during SeV and RSV infections. Interestingly, we found that AP-1 activation and subsequent cytokine production were not modulated by DUSP1, potentially due to the protection provided by the JIP1-JNK interaction. Finally, we show for the first time that DUSP1 promotes apoptosis and suppresses cell migration.

**Conclusion and relevance:** Our data suggest that DUSP1 acts as a negative regulator of tissue repair mechanisms during RSV and SeV infection, making it an interesting potential therapeutic target.

**Keywords :** DUSP1, JIP1, JNK, p38, migration, apoptosis, Respiratory Syncytial Virus, cytokines, Paramyxoviruses, Pneumoviruses.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations.....	viii
Remerciements.....	xiii
Introduction.....	1
1. Les Paramyxovirus et les Pneumovirus.....	2
1.1 D'importantes familles de pathogènes.....	4
1.2 La structure des Paramyxovirus et des Pneumovirus.....	4
1.3 Les pathologies associées à SeV et RSV, deux modèles de virus respiratoires à ARNs b 5	
1.4 Le cycle de réplication de RSV.....	8
2. L'établissement d'une réponse autonome immunitaire innée antivirale.....	11
2.1 La détection de RSV et SeV dans le cytosol.....	11
2.2 L'activation d'IRF3.....	16
2.3 L'activation de NF- $\kappa$ B.....	16
2.4 L'activation d'AP-1.....	17
2.4.1 La cascade de MAPK.....	18
2.4.2 Les fonctions diverses de JNK et p38.....	19
2.4.3 Les protéines d'échafaudage des MAPK.....	23
2.4.4 La régulation négative des voies JNK et p38.....	25
2.4.5 Le lien avec les voies IRF3 et NF- $\kappa$ B.....	26
3. La phosphorylation : un mécanisme de régulation majeur des voies de signalisation antivirales.....	27
3.1 Les phosphatases qui régulent les voies IRF3 et NF- $\kappa$ B.....	27

3.2 La phosphatase DUSP1 dans le contrôle d'AP-1 .....	29
Problématique .....	33
Résultats .....	34
4. DUSP1 regulates apoptosis and cell migration, but not the JIP1-protected cytokine response, during Respiratory Syncytial Virus and Sendai Virus infection.....	34
4.1 Auteurs : liste .....	34
4.2 Contribution des auteurs .....	34
4.3 Article .....	36
4.3.1 Abstract.....	37
4.3.2 Introduction.....	38
4.3.3 Results.....	40
4.3.4 Discussion .....	45
4.3.5 Materials and Methods.....	48
4.3.6 Acknowledgements.....	53
4.3.7 Competing Financial Interests .....	54
4.3.8 References.....	54
4.3.9 Titles and Legends to Figures .....	62
4.3.10 Figures.....	66
4.3.11 Supplementary Figures .....	75
4.3.12 Quantification de la Figure 4 .....	87
Discussion.....	88
Conclusion .....	103
Bibliographie.....	105
Annexe I - Autre publication scientifique.....	i
A high resolution method to monitor phosphorylation-dependent activation of IRF3.....	i
Auteurs : liste .....	i
Contribution des auteurs .....	i
Annexe II - Contribution à un autre article scientifique .....	xi

Proteasome activity within apoptotic exosome-like vesicles: a novel trigger for tertiary lymphoid structure formation and aggravation of rejection .....	xi
Auteurs : liste .....	xi
Contribution des auteurs .....	xi
Abstract.....	xii

## Liste des tableaux

Tableau I. Classification des virus à animaux .....	3
Tableau II. La classification des DUSP .....	30
Tableau III. Quantification des immunoblots présentés à la Figure 4 .....	87



## Liste des figures

<b>Figure 1. Représentation schématique de la structure générale des Paramyxovirus.....</b>	<b>5</b>
<b>Figure 2. Cycle de réplication de RSV. ....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 3. Reconnaissance des virus par différents récepteurs.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 4. Modèle actuel des voies de signalisation impliquées dans la réponse antivirale et pro-inflammatoire à la suite d'une infection par des virus à ARNs, comme SeV et RSV. 15</b>	<b>15</b>
<b>Figure 5. Les différentes protéines d'échafaudage des MAPK.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 6. Représentation schématique des voies JNK et p38 induites par SeV et RSV selon les données de cette étude. ....</b>	<b>89</b>

## Liste des sigles et abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

AEC : Cellules épithéliales du tractus respiratoire

AP-1 : Activating Protein 1

ApoExo : Apoptotic exosomes like vesicles

ARN: Acide ribonucléique

ARNdb: ARN double brin

ARNm: ARN messenger

ARNsb: ARN simple brin

ASAP1 : Arf-GAP with SH3 Domain, ANK Repeat and PH Domain-Containing Protein 1

ASK : Apoptosis Signal-Regulating Kinase

ATF2 : Activating Transcription Factor 2

Bax : Bcl-2-Associated X Protein

BCI : (*E*)-2-Benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (inhibiteur de DUSP1)

Bcl-2 : B-cell Lymphoma 2

Bcl-10 : B-cell lymphoma 10

Bcl-XL: B-cell Lymphoma-Extra Large

CBP: CREB-Binding Protein

CCL: C-C Motif Chemokine Ligand

CDK : Cyclin-Dependent Kinases

COX : Cyclooxygénase

CXCL: C-X-C Motif Chemokine Ligand

CYLD : Cylindromatosis

DCX : Doublecortin

DLG1 : Disks Large Homologue 1

DMARD : Disease Modifying Antirheumatic Drugs

DUBA : Deubiquitinating Enzyme A

DUSP1 : Dual Specificity Phosphatase 1

ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinase

Et al. : Et allie  
Etc. : Et cætera  
EV71 : Entérovirus 71  
FAK : Focal Adhesion Kinase  
GRAF : GTPase Regulator Associated with FAK  
Grb7 : Growth Factor Receptor Bound Protein 7  
GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase 3  
HCC : Carcinomes hépatocellulaires  
IFIT : Interferon-Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats  
IFN: Interféron  
IκB : Inhibitor of κB  
IKK : IκB Kinase epsilon  
IL: Interleukine  
IRF3 : Interferon Regulatory Factor 3  
ISG : IFN-Stimulated Genes  
ISRE : IFN-Stimulated Response Elements  
IV : Virus de l'Influenza  
JIP : JNK-Interacting Protein  
JNK : c-Jun N-Terminal Kinase  
JNKI1 : Peptide inhibiteur de JNK dérivé de JIP1  
JNKI2 : Peptide inhibiteur de JNK dérivé de JIP2  
JSAP1 : JNK/SAPK-Associated Protein 1  
LPS : Lipopolysaccharide  
MAM : Mitochondrial-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes  
MAPs : Microtubules-associated proteins  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases  
MAPKAPK : MAPK-Activated Protein Kinase  
MAPKKK/MEKK/MLK : MAPK kinases kinases  
MAVS : Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein  
MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated Protein 5  
MKK : MAPK kinases

MKP : MAPK Phosphatase  
MMP-9 : Matrix Metalloproteinase 9  
MPOC: Maladie pulmonaire obstructive chronique  
MyD88 : Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88  
NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa B  
NIK : NF- $\kappa$ B-Inducing Kinases  
NLK: Nemo-like kinase  
NLR : NOD-like receptors  
NLRP3 : NLR Family, Pyrin Domain Containing 3  
NOD2 : Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 2  
NS1: Protéine non structurale 1  
NS2: Protéine non structurale 2  
NSCLC : Cancers du poumon à non petites cellules  
OSM : Osmosensing Scaffold for MEKK3  
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
Pax : Paxilline  
PDE4 : Phosphodiesterase-4  
PGN : Peptidoglycane  
PHET : Protein Highly Expressed in Testis  
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase  
PIV: Virus Parainfluenza  
PKL : Paxillin Kinase Linker  
PKR : Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase  
PLC : Phospholipase C  
POSH : Plenty of SH3  
PP1 : Protein Phosphatase 1  
PP2A : Protein Phosphatase 2A  
PPM1B : Protein Phosphatase 1B  
PRR : Pathogen Recognition Receptors  
PTEN : Phosphatase and Tensin Homologues Deleted on Chromosome 10  
RACK1 : Receptor for Activated C Kinase 1

RIG-I : Retinoic Acid-Inducible Gene I  
RLR : RIG-I-like receptors  
ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
RSV: Virus respiratoire syncytial  
SeV: Virus Sendai  
SPAG9 : Sperm Associated Antigen 9  
STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
TAK1: TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1  
TANK: TRAF Family Member-Associated Nuclear Factor  $\kappa$ B Activator  
TBK1: TANK-Binding Kinase 1  
TEER : résistance électrique transépithéliale  
TLR: Toll-like receptors  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TRADD: TNFR1-Associated Death Domain Protein  
TRAF: TNF Receptor-Associated Factor  
TTP : Tristetraproline  
VHR : Vaccinia H1-Related Phosphatase  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
VRK2 : Vaccinia-Related Kinase 2

*À ma mère, la personne la plus forte que je connaisse*

## Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de recherche Nathalie pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux de maîtrise dans son laboratoire et m'avoir inculquer les valeurs d'efficacité et de rigueur scientifique.

J'aimerais également remercier les membres du jury, Dr Nikolaus Heveker et Dr Sylvain Meloche, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche.

I want to thank all the members of the lab for making every day more enjoyable. We were a truly great team. Your presence and good spirit has a lot to do with me coming to the lab with a smile on my face each morning. To Audray, aka The Queen, thank you for always being patient with me and for never panicking when I had last minute orders or Biobar requests. Thank you for being my Québec partner and helping me show the others how we do (and say) things here. But most importantly, thank you for being my milk partner at the sugar shack and each time we had cake. To Elise, the human selfie stick, thank you for being my second pair of hands, especially towards the end of the project. To the "Weys", thank you for being my drawing partners for the P2 door. I really hope this tradition will perpetuate once we are gone. Sandra, the dangerous little Mexican girl, thank you for being my plaque assay and my RSV purification partner. What a good workout it was for our right arm! Natalia, thank you for being who you are, and I know you will accept everyone else's thanks also. Alex, (ALLO!) thank you for being my singing and dancing partner and for having the same musical taste as me. It really helped getting us through long days and nights. As you may have noticed, everyone in the lab was my partner for something, meaning that I was never alone during these three years. Someone was always up for doing anything with me and I thank you for that. So special thanks to everyone, thank you for all the times I had "a favor to ask". I would not have been able to do my master's degree without knowing you always had my back, either for checking my gel migration, or my transfer, or shaking my cells, or putting my membranes in the cold room when I forgot them on the counter (I'm looking at you, Natalia). Sorry for all the times my timer went off for way too long. Lastly, I want to thank the Backstreet Boys for entertaining us and lifting our spirits up during all the Friday afternoons and during the long nights of working alone at the lab.

Merci à mes deux hommes, mes deux amours, Gabriel et Risto, pour le support moral, particulièrement durant ces derniers mois.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents pour m'avoir permis de faire d'aussi longues études, de m'avoir supporté et de toujours m'avoir poussé à me dépasser et à être la meilleure dans ce que je fais.



## **Introduction**

Les maladies infectieuses des voies respiratoires inférieures, dont les infections virales, sont encore de nos jours une cause majeure de mortalité dans le monde avec 3,2 millions de décès en 2015. En effet, il s'agit de la troisième plus importante cause de décès, derrière les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux [1]. La réponse immunitaire innée autonome joue un rôle important dans la résolution des infections virales. Elle se caractérise par deux composantes : une réponse antivirale autonome, c'est-à-dire une réponse antivirale dans la cellule infectée (autocrine) et sur les cellules environnantes (paracrine), et une réponse inflammatoire, qui permet d'attirer les cellules de l'immunité innée. L'incapacité de l'hôte à soutenir une réponse antivirale appropriée mène à un échec de la résolution de l'infection, qui se traduit par une propagation incontrôlée du virus et par des pathologies causées par ce virus. D'un autre côté, une réponse inflammatoire d'une durée incontrôlée engendre des dommages tissulaires associés au développement de plusieurs maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes [2-4]. Afin d'atteindre une durée de réponses antivirale et pro-inflammatoire optimale permettant une élimination brève et efficace de l'infection, la réponse immunitaire innée autonome est soumise à une régulation stricte par des régulateurs positifs et négatifs [5]. Une connaissance approfondie de ces régulateurs est nécessaire afin de pouvoir manipuler ces mécanismes à des fins thérapeutiques.

# 1. Les Paramyxovirus et les Pneumovirus

On distingue les différentes familles de virus animaux par leur morphologie et par la structure de leur génome (Tableau I). On différencie d'abord les virus à ADN des virus à ARN. Les virus à ADN peuvent être de forme icosaédrique, hélicoïdale ou complexe. Ils sont ensuite divisés selon la présence d'une enveloppe protégeant leur capsidie ou non. Leur génome peut être bicaténaire (double brin) ou monocaténaire (simple brin) et peut être de forme circulaire ou linéaire. Les virus à ARN sont d'abord classés selon la forme icosaédrique ou hélicoïdale de leur virion. Les virus en forme d'icosaèdre peuvent être enveloppés ou non. Ils sont ensuite classés selon la polarité de leur ARN. Les virus à ARN de polarité négative doivent d'abord être transcrits en ARN messagers (ARNm) avant d'être traduits en protéines par une ARN polymérase ARN-dépendante. Les virus à ARN de polarité positive peuvent traduire leur ARN directement en protéines sans avoir recours à une ARN polymérase ARN-dépendante.

Tableau I. Classification des virus à animaux

Virus à ADN					
Morphologie	Icosaèdre			Hélicoïdal	Complexe
Enveloppe	Non-enveloppé	Enveloppé	Non-enveloppé / enveloppé (cytoplasmique)	Enveloppé	Enveloppé (cytoplasmique)
Acides nucléiques	Simple brin	Double brin	Double brin	Double brin	Double brin
Virus	Parvoviridae (L)	Herpesviridae (L) Hepadnaviridae (C)	Iridoviridae (L)	Baculoviridae (C)	Poxviridae (L)

Virus à ARN					
Morphologie	Icosaèdre			Hélicoïdal	
Enveloppe	Non-enveloppé		Enveloppé	Enveloppé	
Acides nucléiques	Double brin	+	+	+	-
Familles de virus	Reoviridae (S)	Caliciviridae	Flaviviridae	Coronaviridae	Arenaviridae (S)
	Birnaviridae	Picornaviridae	Togaviridae		Bunyaviridae (S)
			Retroviridae		Orthomyxoviridae (S)
					Bornaviridae
					Filoviridae
					Nyamiviridae
					Rhabdoviridae
					Sunviridae
					Paramyxoviridae
					Pneumoviridae

C : génome circulaire. L : génome linéaire. S : génome segmenté. Adapté de [6] et [7].

Les Paramyxovirus sont les virus de la famille des *Paramyxoviridae*. Parmi la famille des *Paramyxoviridae*, on compte les genres *Aquaparamyxovirus*, *Avulavirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbilivirus*, *Respirovirus* et *Rubulavirus*. Les Pneumovirus font partie de la famille des *Pneumoviridae*, qui englobent les genres *Metapneumovirus* et *Orthopneumovirus*. Les Pneumovirus se distinguent des Paramyxovirus par leurs protéines M2-1 et M2-2, ce qui a justifié leur classification dans différentes familles [7, 8].

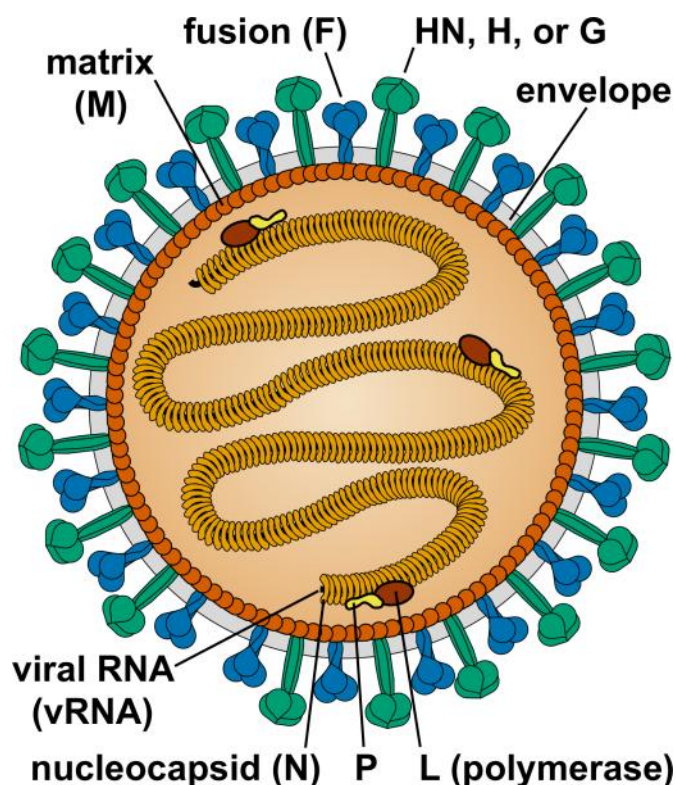
## 1.1 D'importantes familles de pathogènes

Les Paramyxovirus englobent beaucoup de virus pathogènes pour l'humain pouvant entraîner des complications graves et pour lesquels des traitements efficaces ne sont pas toujours disponibles. Par exemple, les *Avulavirus* comprennent le virus de la maladie de Newcastle, qui provoque des symptômes semblables à la grippe chez l'homme. Le genre *Henipavirus* est formé de deux virus pathogènes, soit le virus Hendra, qui peut causer des atteintes respiratoires ou neurologiques mortelles, et le virus Nipah, causant des encéphalites sévères chez l'homme. Le virus de la rougeole, causant un exanthème morbilliforme typique et pouvant entraîner des encéphalites qui s'avèrent parfois létales, provient du genre des *Morbilivirus*. Les *Respirovirus* comprennent les virus Parainfluenza (PIV) humains 1 et 3, qui constituent la deuxième cause d'infections respiratoires des voies inférieures chez les enfants. Les *Rubulavirus* comprennent le virus des oreillons, qui entraîne une inflammation des glandes salivaires, et les PIV humains 2 et 4. Finalement, parmi les Pneumovirus, les *Metapneumovirus* entraînent des infections aiguës des voies respiratoires et les *Orthopneumovirus* comprennent le virus respiratoire syncytial (RSV), le pathogène causant le plus d'infections respiratoires des voies inférieures chez les enfants.

## 1.2 La structure des Paramyxovirus et des Pneumovirus

Les Paramyxovirus et les Pneumovirus ont une structure très semblable. Il s'agit de virus à ARN simple brin (ARNsb) de polarité négative, qui portent en général six gènes codant pour environ 11 protéines connues grâce au chevauchement des cadres de lecture et aux modifications post-transcriptionnelles [9]. Ils sont formés de différentes protéines de nucléocapside, soit la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la grande sous-unité de la polymérase L et le facteur d'élongation de transcription M2-1 dans le cas des Pneumovirus. Ils sont recouverts de trois protéines transmembranaires de l'enveloppe, soit la protéine de fusion F, la protéine d'attachement G et la petite protéine hydrophobe SH. Ils ont aussi une protéine de matrice M et les Pneumovirus ont un facteur régulateur de l'ARN M2-2 [9]. Les *Orthopneumovirus* codent aussi pour deux protéines non structurales 1 et 2 (NS1) et (NS2)

[10]. Les *Rubulavirus*, les *Avulavirus* et certains *Respirovirus* ont un génome qui comporte les protéines accessoires hémagglutinine et neuraminidase HN. Certains virus, comme les *Henipavirus*, les *Respirovirus* et les *Morbilivirus* possèdent la protéine non structurale C [9, 11]. La Figure 1 montre la structure générale des Paramyxovirus, à titre d'exemple.



**Figure 1.** Représentation schématique de la structure générale des Paramyxovirus.

L'ARN est encapsidé par les protéines de la nucléocapside N, qui sont associées à la phosphoprotéine P et à la polymérase L. Le génome encapsidé est contenu dans l'enveloppe, formée de la membrane cytoplasmique cellulaire, sous laquelle se retrouve les protéines de la matrice M, et dans laquelle sont insérées les protéines de fusion F et d'attachement (HN, H, ou G, selon l'espèce). Source [12] avec la permission de Taylor & Francis.

### 1.3 Les pathologies associées à SeV et RSV, deux modèles de virus respiratoires à ARNsb

Le virus Sendai (SeV), faisant partie des *Respirovirus*, est communément utilisé en tant que modèle pour les virus à ARNsb. Bien qu'il ne représente pas un danger pour l'homme, il s'agit d'un pathogène respiratoire chez les rongeurs. De plus, la souche Cantell, utilisée dans

cette étude, a la capacité d'induire une réponse antivirale dans les cellules pulmonaires humaines, ce qui en fait un bon modèle pour étudier la réponse innée antivirale autonome contre les Paramyxovirus. Finalement, SeV est aussi utilisé comme vecteur pour le développement de vaccins contre RSV [12].

RSV est l'agent étiologique qui cause le plus d'infections pédiatriques des voies respiratoires inférieures dans le monde. Il s'agit du principal virus causant la pneumonie [13]. L'infection des voies respiratoires inférieures par RSV est caractérisée par la prolifération, la nécrose et la desquamation de l'épithélium cilié, par l'accumulation de lymphocytes au niveau des bronches et par un exsudat composé de mucus, de cellules épithéliales desquamées, de neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages. Elle provoque aussi le durcissement de la paroi alvéolaire [14].

Le spectre des pathologies associées à RSV est large, allant de la rhinite à la bronchiolite, qui est associée à une morbidité et à une mortalité élevée [15]. Plusieurs facteurs contribuent à aggraver la sévérité de la pathologie, notamment les naissances prématurées ou certaines pathologies comme la bronchodysplasie pulmonaire ou les cardiopathies. De plus, une affection sévère liée à RSV au cours de l'enfance s'avère un facteur favorisant le déclenchement d'asthme à l'adolescence [16], l'hyperréactivité bronchique ainsi que la respiration sifflante à l'âge adulte [17-19]. RSV conduit également à des affections sévères chez les personnes âgées et les sujets immunodéprimés et induit une exacerbation de la pathologie chez les patients atteints de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) ou de la fibrose kystique. Il a notamment été montré que RSV persiste chez les patients atteints de MPOC, induisant des dommages structuraux au niveau des poumons [20].

On sait que la réponse immunitaire innée est une composante importante de la pathogenèse de RSV. En effet, il semble y avoir une puissante réponse inflammatoire dans les voies respiratoires inférieures des enfants infectés par RSV, qui se caractérise par une forte production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles le « C-C Motif Chemokine Ligand » (CCL) 2, le CCL3, le CCL4, le CCL5, le « C-X-C Motif Chemokine Ligand » (CXCL) 8, CXCL10, l'« interféron » (IFN)  $\alpha$ , l'IFN $\beta$ , l'interleukine 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ), l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le « Tumor Necrosis Factor » alpha (TNF- $\alpha$ ) [21, 22]. Ce phénomène est communément appelé « cytokine storm » et peut être fatal. En effet, les patients atteints de

RSV meurent souvent des dommages aux poumons causés par cette production excessive de cytokines plutôt que de l'infection elle-même. L'utilisation de corticostéroïdes pour diminuer la réponse inflammatoire est fortement répandue pour les infections par RSV. Cependant, les cas sévères d'infection par RSV sont liés à une réponse immunitaire innée défectueuse et insuffisante et à des concentrations plus faibles de cytokines dans les voies respiratoires. On ne sait pas toutefois si ces enfants auraient à la base avoir un système immunitaire anormal, ce qui les prédisposerait à des pathologies à RSV plus sévères [23]. L'utilisation de corticostéroïdes peut donc être très néfaste dans ces cas sévères, sachant que ces enfants manifestent déjà une immunosuppression.

Grâce à ses protéines NS1 et NS2, RSV n'induit que faiblement l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$ . Par contre, la souche Long, couramment utilisée dans les laboratoires, induit l'IFN $\alpha$  et  $\beta$ , ce qui n'est pas représentatif des souches cliniques. De plus, RSV est peu immunogénique, ce qui contribue aux difficultés de production de vaccins. Seuls les anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines F et G permettent la neutralisation du virus [14].

Malgré son importance quant à la comorbidité et aux taux de mortalité qui sont associés à RSV, aucun vaccin n'est encore disponible. Cette situation est principalement due au manque de connaissances quant à la pathogenèse de RSV et à la réponse immunitaire et inflammatoire qu'il enclenche. Un essai vaccinal effectué dans les années 1960 a conduit à un échec avec une incidence de mortalité plus importante dans le groupe d'enfants vaccinés. Le vaccin était composé de RSV inactivé par la formaline [24]. L'utilisation de RSV atténué pourrait donc être une stratégie alternative attrayante, car il n'entraîne pas de maladies associées aux vaccins, contrairement au vaccin de RSV inactivé par la formaline. RSV atténué mime une faible infection naturelle tout en induisant une réponse immunitaire cellulaire et humorale durable. L'utilisation de RSV atténué semble donc être la meilleure option. Toutefois, il est difficile d'obtenir un vaccin assez atténué et à la fois immunogénique. Effectivement, certains vaccins testés n'étaient pas suffisamment atténués [25, 26], tandis que d'autres ne provoquaient pas d'immunisation [27].

Seul un traitement prophylactique très coûteux semble être efficace, mais il est réservé à un nombre très limité d'enfants présentant un risque élevé de présenter une pathologie sévère. En effet, le Palivizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine F de RSV,

doit être administré mensuellement par prévention chez les enfants à haut risque d'infection par RSV, ce qui engendre des coûts considérables [28]. En effet, au Canada, pour un enfant avec un poids moyen de 5 kg, on estime les coûts du Palivizumab à 5 600 \$ au minimum pour le traitement au cours des mois à risque [29]. Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le développement de ces thérapies requiert une connaissance détaillée des mécanismes de pathogenèse ainsi que de la réponse immunitaire associés à RSV, qui est encore très limitée.

Dans cette étude, nous utilisons les virus SeV et RSV comme modèles d'infection par des virus respiratoires. Étant situés dans des familles différentes, ils permettent de dresser un portrait représentant un large spectre de virus respiratoires à ARNs dans l'établissement d'une réponse immunitaire innée antivirale autonome.

## **1.4 Le cycle de réplication de RSV**

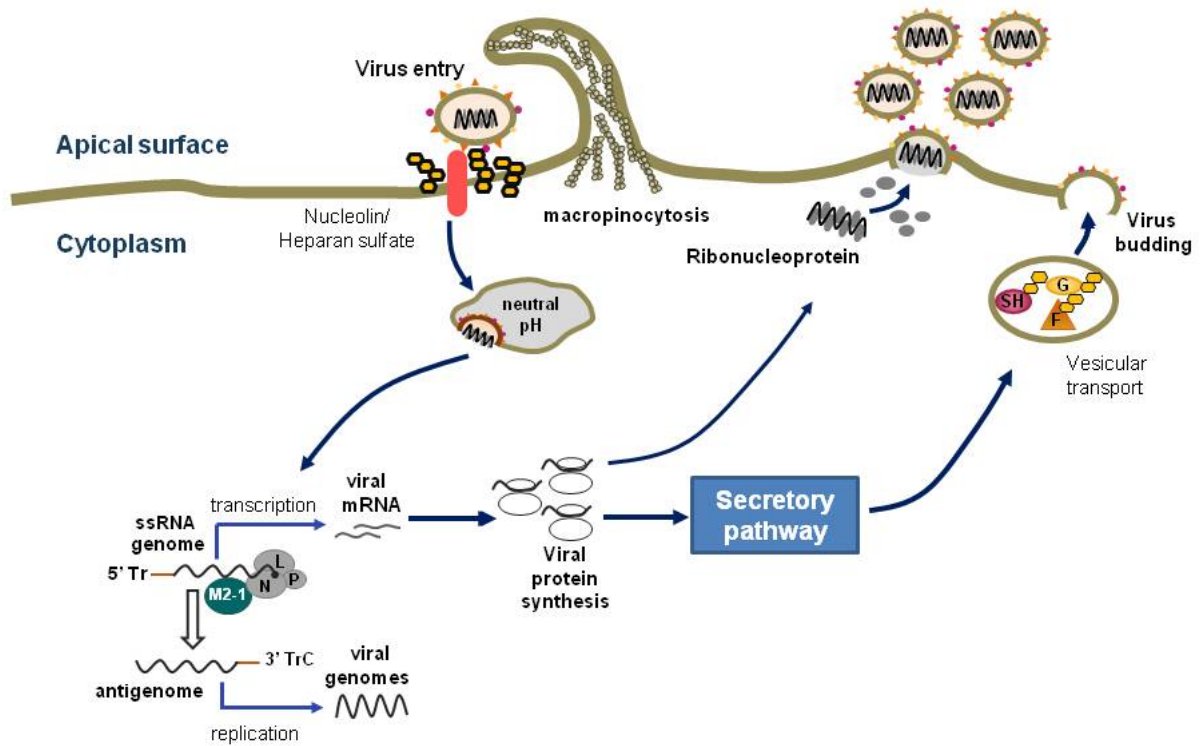
Les cellules épithéliales du tractus respiratoire (AEC) sont les premières cellules à entrer en contact avec les virus respiratoires. Elles représentent non seulement une barrière physique, mais jouent également un rôle clé dans le développement de la défense immunitaire innée, incluant les réponses antivirale autonome et pro-inflammatoire, qui déterminent la progression ou la résolution de l'infection.

Le cycle de réplication de RSV commence par l'attachement du virion aux glycosaminoglycanes, comme le sulfate d'héparane, à la surface de la cellule via sa protéine G [30] (Figure 2). Cet attachement induit l'activation de la protéine F, qui interagit avec la nucléoline et les microdomaines riches en cholestérol de la membrane cellulaire, permettant la fusion des membranes du virus et de la cellule [31, 32]. La nucléocapside entre alors dans le cytoplasme par macropinocytose engendrée par le réarrangement des filaments d'actine. La « furin-like protease » induit le clivage de la protéine F, permettant la complétion de la fusion des membranes virales et cellulaires dans le macropinosome [33].

La protéine L, qui est une ARN polymérase ARN-dépendante encapsidée dans le virion, se lie à la région promotrice en 3' de l'ARN viral et commence la transcription du



premier gène, codant pour la protéine NS1, en ARNm. Elle continue son chemin jusqu'à la région intergénique riche en uracile, ce qui provoque un glissement de la polymérase et entraîne la formation d'une queue polyadénine sur l'ARNm. Les gènes sont tous séparés par des séquences intergéniques variables, contenant la région riche en uracile, sauf M2 et L, qui se chevauchent. Au niveau de la région riche en uracile, la polymérase peut alors décrocher ou continuer son chemin et transcrire le gène suivant. Si elle décroche, elle doit recommencer à transcrire en 3', car elle a besoin de la région promotrice pour initier la transcription. Ce mécanisme permet de produire une plus grande quantité de protéines codées par les gènes qui sont plus près de l'extrémité 3' et peu de protéines pour celles codées par les gènes près de l'extrémité 5' de l'ARN viral. L'ordre des gènes de l'ARN viral est 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'. La polymérase induit aussi une guanylation et une méthylation de l'ARNm, formant une structure CAP en 3' de l'ARNm, ce qui lui permet d'être traduit par la machinerie de la cellule [9]. La protéine P agit comme co-facteur pour la transcription et la protéine M2-1 aide à la processivité de la polymérase [34]. Une fois traduites, les protéines SH, G et F migrent à la surface de la cellule via la voie de sécrétion des protéines [35]. Lorsque la protéine N atteint une certaine abondance, cela provoque un changement de fonction de la polymérase, possiblement grâce à la protéine M2-2 [36], qui commence alors à répliquer le génome viral entier pour former un ARN de polarité positive. Cet ARN servira d'intermédiaire de répllication afin de transcrire le génome d'ARN de polarité négative pour les nouveaux virions. Le complexe de ribonucléoprotéines, formé des protéines P, N, L et M2-2 nouvellement traduites et de l'ARN viral, traverse le cytoplasme pour migrer à la surface de la cellule. L'assemblage coordonné des protéines et de l'ARN viraux pour former les virions se fait via la protéine M, qui est distribuée près des protéines F et G au niveau de la membrane et qui interagit avec le complexe de ribonucléoprotéines. La sortie des virions se fait par bourgeonnement via un réarrangement des filaments d'actines et leur interaction avec la protéine M [37].



**Figure 2. Cycle de réplication de RSV.**

Les virions entrent du côté apical des AEC par macropinocytose, qui est induite par l'attachement de la protéine G aux glycosaminoglycannes et l'interaction de la protéine F avec la nucléoline, de manière pH-indépendante [38]. Le génome viral est alors transcrit en ARNm et traduit en protéines. Les protéines de l'enveloppe sont sécrétées à la surface des cellules par le transport vésiculaire. L'accumulation de la protéine N induit la production d'un antigénome afin d'enclencher la réplication du génome viral, qui sera encapsidé dans les virions nouvellement produits, qui s'échapperont de la cellule par bourgeonnement.

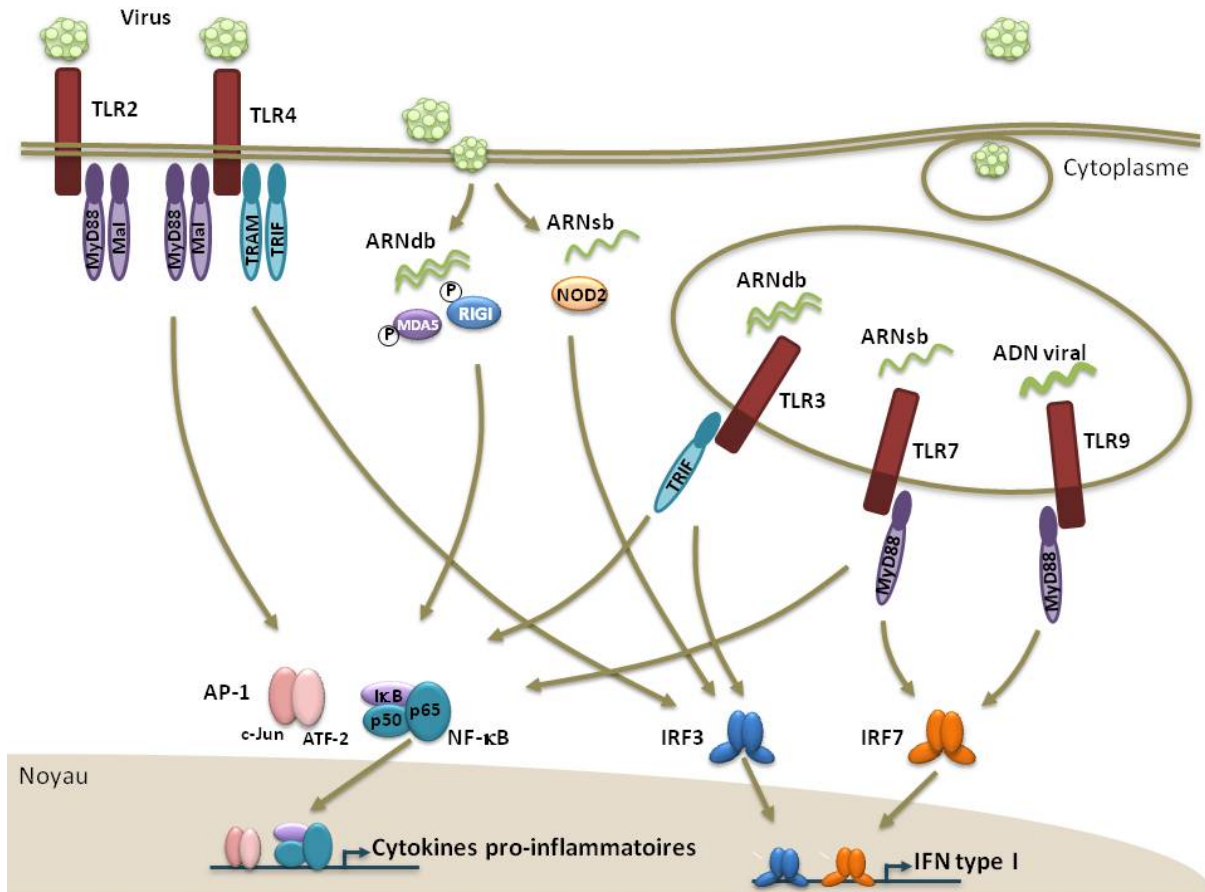
RSV peut aussi infecter les cellules environnantes sans avoir à sortir de la cellule par bourgeonnement et à rentrer dans une nouvelle cellule par macropinocytose. En effet, la protéine F, exprimée à la surface des cellules infectées, induit la fusion directe des cellules infectées avec les cellules non infectées environnantes, provoquant la formation de syncytium (cellule géante possédant plusieurs noyaux), permettant une propagation plus rapide du virus [14].

## **2. L'établissement d'une réponse autonome immunitaire innée antivirale**

Les AEC détectent la présence de virus respiratoires par des senseurs moléculaires qui reconnaissent les « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMP). Cette reconnaissance induit l'expression des gènes de la phase précoce de la réponse autonome immunitaire innée, notamment les gènes codant pour des cytokines et des chimiokines antivirales, comme les IFN de type I (IFN $\alpha/\beta$ ) et III (IFN $\lambda$ ), et pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  et le CCL5, aussi connu sous le nom de RANTES [39-41]. Les IFN agissent de manière autocrine et paracrine sur les AEC pour induire l'expression des « IFN-Stimulated Genes » (ISG), qui codent pour des protéines à activité antivirale. Ces derniers inhibent les mécanismes de transcription et de traduction, inhibent la croissance cellulaire, provoquent l'apoptose et modulent la réponse immunitaire, ce qui restreint la réplication et la propagation du virus [42-44]. L'axe pro-inflammatoire de la réponse permet de recruter des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes dans les voies respiratoires au site d'infection afin de développer une réponse immunitaire adaptative appropriée.

### **2.1 La détection de RSV et SeV dans le cytosol**

L'immunité innée repose sur les « Pathogen Recognition Receptors » (PRR) intra- ou extracellulaires, qui détectent les PAMP. Plusieurs PRR sont impliqués dans la reconnaissance innée des virus, incluant les « RIG-I-like Receptors » (RLR), les « Toll-like Receptors » (TLR) et les « NOD-like Receptors » (NLR) (Figure 3).



**Figure 3. Reconnaissance des virus par différents récepteurs.**

Les TLR2 et TLR4 sont encrés à la surface de la cellule. Le TLR2 active les voies NF-κB et MAPK dépendantes de MyD88. Le TLR4 reconnaît les protéines virales et active des voies dépendantes, mais aussi indépendantes de MyD88, qui mènent à l'activation d'IRF3. Les TLR3, TLR7 et TLR9 se retrouvent sur l'endosome. Les RLR MDA5 et RIG-I reconnaissent l'ARNdb et le NLR NOD2 reconnaît l'ARNs dans le cytoplasme. Adapté de Torres-Pedraza *et al.* [45] et Thompson *et al.* [46].

Il a été montré que RSV est reconnu par plusieurs PRR, soit les TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, le « Retinoic Acid-Inducible Gene 1 » (RIG-I), la « Melanoma Differentiation-Associated Protein 5 » (MDA5) et la « Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 2 » (NOD2), et que le « cross-talk » entre les réponses PRR était spécifique à chaque type cellulaire en réponse à RSV [47, 48]. TLR2 et TLR4 reconnaissent RSV du côté extracellulaire. En fait, TLR4 reconnaît la protéine F de RSV avec l'aide du corécepteur CD14 [49]. TLR3 se retrouve au niveau de l'endosome et reconnaît l'ARN double brin (ARNdb), un intermédiaire de réplication du génome de RSV [50]. La manière dont

l'ARNdb se retrouve dans l'endosome n'est pas claire, mais il a été proposé que dans les cellules dendritiques, le transport d'acides nucléiques pourrait se faire via un mécanisme d'autophagie durant lequel les acides nucléiques viraux seraient transportés par le lysosome, qui viendrait fusionner avec l'endosome, où se retrouve le TLR3 [51, 52]. Cependant, le mécanisme d'autophagie en réponse à RSV n'a pas encore été décrit dans les AEC [47]. TLR7 reconnaît l'ARNsb de manière intracellulaire également [53]. Tous les TLR, sauf TLR3, activent la voie de signalisation « Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 » (MyD88)-dépendante, tandis que TLR3 et TLR4 activent la voie « TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon- $\beta$  » (TRIF)-dépendante. NOD2, bien qu'il soit mieux connu dans le contexte des infections bactériennes, reconnaît l'ARNsb dans les premiers stades de l'infection [54]. RIG-I est nécessaire à l'activation de la réponse autonome immunitaire dépendant des ISG15, ISG54 et ISG56 en réponse à RSV [55]. Il est maintenant clair que dans les AEC, RIG-I et MDA5, son homologue structurel, sont les récepteurs majeurs de RSV [47].

La souche Cantell de SeV, celle utilisée dans cette étude, est reconnue par RIG-I et par MDA5 et induit la production d'IFN de type I et d'ISG [56-59]. Il a été démontré que TLR7 reconnaît aussi l'ARNsb de SeV en comparant l'induction de l'IFN $\alpha$  de cellules dendritiques normales ou déficientes en TLR7 [51]. « NLR Family, Pyrin Domain Containing 3 » (NLRP3) serait aussi un senseur de SeV, cependant, cela pourrait être de manière indirecte, via l'activation de stress cellulaire, tel l'ATP ou l'acide urique, plutôt que par l'ARN viral directement [60-62].

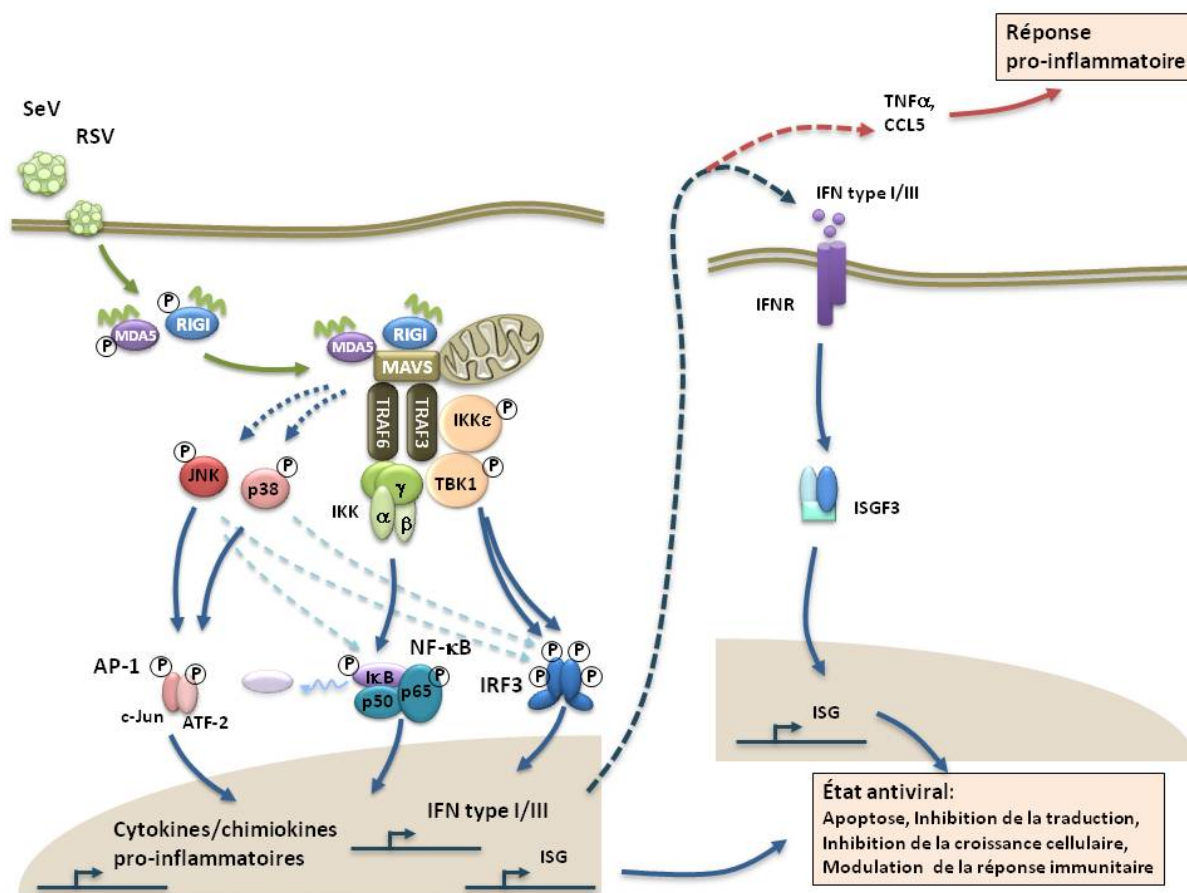
RIG-I et MDA5 contribuent activement à la formation de l'état antiviral [63]. Des analyses biochimiques et structurales ont commencé à élucider la préférence de RIG-I et MDA5 pour différents ligands d'acide nucléique. En effet, des intermédiaires de réplication (ARNdb) ou de courtes séquences d'ARNsb ayant une section double brin (structure « panhandle ») sont suffisantes pour être reconnues par RIG-I [47, 64], tandis que MDA5 répond plus spécifiquement à de longues séquences ramifiées d'ARNdb [65]. Bien qu'on pensait initialement que RIG-I et MDA5 reconnaissaient des familles distinctes de virus, il a été documenté que plusieurs virus, dont des virus à ARNsb, sont reconnus par les deux récepteurs et que ces derniers coopèrent pour induire l'activation d'IFN de type II [59, 66].

Le modèle actuel de la coopération de RIG-I et MDA5 dans la régulation de la réponse antivirale contre les virus à ARNs stipule que ces deux senseurs activent des voies de signalisation communes en aval. En lien avec ce modèle, notre laboratoire a récemment montré que RIG-I et MDA5 sont tous les deux essentiels pour l'expression efficace de cytokines dépendantes de l'« Interferon Regulatory Factor 3 » (IRF3) (IFN de type I et III) et du « Nuclear Factor kappa B » (NF- $\kappa$ B) (IL-6 et TNF- $\alpha$ ) en réponse à l'infection par RSV. Cependant, une analyse détaillée de l'activation d'IRF3 et de NF- $\kappa$ B en aval de RIG-I et MDA5 a conduit à proposer que RIG-I et MDA5 aient des fonctions distinctes. Dans ce nouveau modèle, RIG-I conduit à l'initiation de la réponse antivirale, tandis que MDA5 est essentiel pour le maintien de cette réponse [48].

Malgré leurs différences quant à leurs propriétés d'attachement aux ligands, RIG-I et MDA5 activent des cascades de signalisation communes. L'attachement de fragments d'ARN à RIG-I ou à MDA5 induit leur interaction avec l'adaptateur « Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein » (MAVS), aussi connue sous le nom de Cardif/IPS-1/VISA [67-69]. On pensait initialement que MAVS était localisé uniquement au niveau de la membrane externe de la mitochondrie [70], mais on sait à présent que différentes « populations » de MAVS coexistent. Il a été démontré que MAVS est également ancré dans la membrane du peroxyosome [71] et des « Mitochondrial-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes » (MAM) [72]. Bien que des études aient été faites pour déterminer les différences entre les fractions de MAVS, la discordance des résultats rend les conclusions difficiles. Il est toujours incertain si un rôle sélectif du MAVS mitochondrial, des peroxyosomes et des MAM existe [71, 73].

L'interaction de RIG-I ou MDA5 avec MAVS initie un processus d'agrégation de MAVS, qui est nécessaire à l'activation de la réponse antivirale de la cellule [74]. L'activation de MAVS conduit au recrutement de plusieurs protéines de signalisation afin de former un complexe de signalisation macromoléculaire au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, connu sous nom de signalosome. Le signalosome est formé notamment de « TNF Receptor-Associated Factor » 3 (TRAF3), TRAF6, « TRAF Family Member-Associated Nuclear Factor  $\kappa$ B Activator » (TANK), et « TNFR1-Associated Death Domain Protein » (TRADD) [75]. Ces interactions activent plusieurs voies de signalisation en aval, ce

qui mène par la suite à l'activation coordonnée de trois facteurs de transcription : IRF3, NF- $\kappa$ B et « Activating Protein 1 » (AP-1) [41, 76, 77] (Figure 4). Ces facteurs de transcription régulent l'expression de gènes antiviraux et pro-inflammatoires [78]. L'activation coordonnée des facteurs de transcription mène à leur attachement à des sites adjacents bien définis dans la région promotrice de plusieurs gènes afin de former une structure « enhanceosome » qui permettra par la suite l'expression de ces protéines antivirales et pro-inflammatoires [79].



**Figure 4. Modèle actuel des voies de signalisation impliquées dans la réponse antivirale et pro-inflammatoire à la suite d'une infection par des virus à ARNs, comme SeV et RSV.**

Les récepteurs cytosoliques RIG-I et MDA5 reconnaissent l'acide nucléique viral. Les effecteurs MAVS et TRAF6 en aval transmettent le signal au complexe IKK ( $\alpha/\beta/\gamma$ ) pour activer NF- $\kappa$ B (p65/p50). En aval de MAVS, l'adaptateur TRAF3 assure l'activation des kinases IKK $\epsilon$  et TBK1, qui phosphorylent IRF3, qui se dimérise et s'accumule dans le noyau. En aval de MAVS, des voies de signalisation conduisent à la phosphorylation des MAPK p38 et JNK pour activer la formation du complexe AP-1 (ATF2/c-jun). Les facteurs de transcription IRF3, NF- $\kappa$ B et AP-1 permettent l'expression de cytokines pro-inflammatoires, comme TNF- $\alpha$  et CCL5, et antivirales, comme les IFN de type I et III, qui mènent à un état antiviral.

## 2.2 L'activation d'IRF3

IRF3 est constitutivement exprimé dans le cytoplasme des cellules non stimulées. L'activation d'IRF3 par une infection virale repose sur des processus de phosphorylations complexes impliquant plusieurs sites phosphoaccepteurs dans la région C-terminale. Il a été décrit que les kinases « I $\kappa$ B Kinase epsilon » (IKK $\epsilon$ ) et « TANK-Binding Kinase 1 » (TBK1) sont essentielles à l'activation d'IRF3 [80-83] (Figure 4). Dans des cellules non-stimulées, on retrouve deux formes d'IRF3 : la forme non-phosphorylée (forme I) et la forme hypophosphorylée (forme II). L'infection virale induit l'hyperphosphorylation d'IRF3 en C-terminale au niveau de deux régions de sites phosphoaccepteurs importants, soit Ser385/Ser386 et Ser396/Ser398/Ser402/Thr404/Ser405 [82, 84-88]. Les formes III et IV d'IRF3 représentent les formes hyperphosphorylées. Une fois qu'IRF3 est activé par phosphorylation, il dimérise, puis s'accumule dans le noyau, pour ensuite se lier aux séquences consensus des « IFN-Stimulated Response Elements » (ISRE) et s'associer avec les coactivateurs : la « CREB-Binding Protein » (CBP) ou la p300 pour transactiver les gènes cibles [89, 90]. Il est finalement dégradé par le protéasome à la suite de sa polyubiquitination [87, 91]. Il est intéressant de noter que la protéine V de certains Paramyxovirus comme PIV a la capacité d'imiter IRF3, ce qui lui permet d'entrer en compétition avec IRF3 pour le site catalytique de TBK1/IKK $\epsilon$ . La protéine V est donc phosphorylée aux dépens d'IRF3, qui reste inactif [92].

En plus de jouer un rôle clé dans la régulation de la transcription de l'IFN, IRF3 module aussi un état antiviral précoce indépendant de l'IFN via l'expression d'une foule de gènes antiviraux. Parmi ceux-ci, on peut compter l' « Interferon-Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats » (IFIT) 1/ISG56, l'IFIT2/ISG54 et l'IFIT3/ISG60 [93, 94].

## 2.3 L'activation de NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est une famille ubiquitaire d'homo- et d'hétérodimères regroupant p65, cRel, RelB, p50 et p52. NF- $\kappa$ B est activé par au moins deux voies distinctes, soit la voie canonique et la voie non-canonique. NF- $\kappa$ B transactive des gènes avec une spécificité et une cinétique



qui varient selon le gène, le stimulus et la cellule. L'expression rapide et transitoire des gènes NF- $\kappa$ B-dépendants est associée à la voie canonique, tandis que la voie non canonique est essentielle pour la transcription de gènes différée et soutenue [95]. La voie canonique repose sur l'activation de l'« Inhibitor of  $\kappa$ B » (I $\kappa$ B), formé de IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et IKK $\gamma$ . Le complexe IKK $\alpha/\beta/\gamma$  phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$ , qui inhibait le dimère NF- $\kappa$ B en s'y liant dans le cytoplasme. La phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  favorise sa ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, ce qui permet de libérer le dimère NF- $\kappa$ B, principalement p65 et p50, afin qu'il s'accumule dans le noyau [96, 97] (Figure 4). Les modifications post-traductionnelles additionnelles des sous-unités Rel améliorent leur association au promoteur et leur capacité de transactivation [98]. La synthèse d'I $\kappa$ B médiée par NF- $\kappa$ B engendre la terminaison de cette voie de signalisation via une boucle de rétroaction inhibitrice. En effet, I $\kappa$ B entre dans le noyau et ramène le dimère NF- $\kappa$ B dans le noyau avec lui [99]. La voie non-canonique principale fonctionne par l'activation des « NF- $\kappa$ B-Inducing Kinases » (NIK). L'abondance de NIK est régulée par la dégradation de NIK par le protéasome, qui est dépendante de TRAF3 dans les cellules non stimulées. La dégradation induite par un stimulus de TRAF3 permet la stabilisation de NIK, qui phosphoryle et active la kinase IKK $\alpha$ . IKK $\alpha$  phosphoryle le précurseur p100 afin d'activer sa transformation dans le protéasome en sous-unité p52 mature. p52 migre alors dans le noyau en formant un dimère avec RelB [100, 101].

## 2.4 L'activation d'AP-1

Nos connaissances sur l'activation du facteur de transcription AP-1 durant l'infection virale sont encore très limitées. La cascade d'activation classique induite par l'infection virale mène ultimement à la formation de l'hétérodimère formé de l'« Activating Transcription Factor 2 » (ATF2) et de c-Jun. AP-1 (ATF2/c-Jun) participe à la formation de la structure « enhanceosome » qui permet l'expression de l'IFN $\beta$  [76, 102, 103]. Les événements en amont d'ATF2 et de c-Jun impliquent l'activation de plusieurs « Mitogen-Activated Protein Kinases » (MAPK).

Les MAPK sont des protéines kinases spécifiques pour la sérine et la thréonine qui sont regroupées en voies de signalisation distinctes, les trois principales étant la voie

« Extracellular Signal-Regulated Kinase » (ERK1/2 ou p42/p44 MAPK), la voie « c-Jun N-Terminal Kinase » (JNK) et la voie p38 MAPK. Il existe aussi la famille d'ERK5 et les MAPK atypiques ERK3/4, ERK7/8 et la « Nemo-like kinase » (NLK). Les MAPK sont activées par une grande variété de stimuli et sont impliquées dans la régulation d'une multitude de fonctions cellulaires essentielles [104, 105]. Il existe trois isoformes de JNK, soit JNK1, JNK2 et JNK3, et une dizaine de variants d'épissage alternatif allant de 46 kDa à 55 kDa [106]. JNK3 se retrouve principalement dans les neurones, les testicules et le cœur, tandis que JNK1 et JNK2 sont ubiquitaires [107]. p38 existe sous quatre isoformes : p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ . p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  ont des fonctions et un profil d'expression plus spécifiques, tandis que p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  sont les formes majeures et ubiquitaires [108]. Il existe 5 sous-familles d'ERK, ERK1 et ERK2 étant les mieux connues [104].

#### **2.4.1 La cascade de MAPK**

ATF2 et c-Jun sont activés par des MAPK, qui sont préalablement activées par des MAPK kinases (MKK), en aval de MAPK kinases kinases (MAPKKK/MEKK/MLK). Ces cascades de MAPK sont toutes activées par des événements de phosphorylation. Selon le type de stimulation, le complexe AP-1 peut être formé des sous-unités Jun (c-Jun, JunB et JunD), Fos (c-FOS, FosB, Fra et Fra 2), ATF (ATF2, ATF3, B-ATF, JDP1 et JDP2) et Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K, Nrl) [109]. Toutefois, ce sont ATF2 et c-Jun qui sont les principales sous-unités d'AP-1 induites lors d'infections virales [110-112]. ATF2 et c-Jun sont activés par les MAPK p38 et JNK respectivement, qui migrent du cytoplasme au noyau pour induire leur phosphorylation [76, 102, 103] (Figure 4). Plusieurs virus respiratoires induisent l'activation de JNK et p38 [103, 112-114]. Toutefois, les événements menant à l'activation de JNK et p38 dans l'infection virale sont encore nébuleux à ce jour. Il a été montré que RIG-I et MAVS agissent en amont des MAPK JNK et p38 dans l'infection SeV [115]. L'activation des MAPK dépend aussi des adaptateurs TRAF. Cependant, on ne sait pas si RIG-I et MDA5 agissent en amont des TRAF à la suite d'une infection virale. Les adaptateurs TRAF permettent l'activation des MAPKKK, qui agissent en amont des MKK. Dans l'infection virale, l'activation de JNK est dépendante de MKK4 et MKK7 [114, 116-118] et p38 est activé par

MKK3 et MKK6 [119]. Toutefois, l'activation de JNK et p38 par les différents MKK dépend grandement du stimulus. Dans différents contextes, les MKK3, MKK4, MKK6 et MKK7 peuvent être activés par une multitude de MAPKKK, soit MEKK1/2/3/4, MLK1/2/3, Tpl-2, DLK, TAO1/2, « TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1 » (TAK1) et « Apoptosis Signal-Regulating Kinase » (ASK)1/2 [108, 120]. Cependant, seules les MAPKKK ASK1, TAK1, MEKK1 et MLK3 ont été décrites comme étant impliquées dans la réponse antivirale jusqu'à présent [121-126].

## **2.4.2 Les fonctions diverses de JNK et p38**

En plus d'activer différentes sous-unités d'AP-1, JNK et p38 phosphorylent plus d'une cinquantaine de protéines [127]. Il est donc évident qu'ils soient impliqués dans une multitude de fonctions cellulaires.

### **2.4.2.1 La régulation de cytokines par les voies JNK et p38**

Une des fonctions majeures de JNK et p38 est non seulement la régulation de l'enhanceosome contrôlant l'expression de l'IFN $\beta$ , mais aussi la modulation de la production de cytokines pro-inflammatoires, via la régulation du facteur de transcription AP-1 [76, 102, 103]. RSV induit de l'inflammation au niveau des poumons via l'induction précoce de cytokines, particulièrement la surexpression de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, CXCL10, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  [21, 22], qui contribuent grandement à la pathogenèse de RSV. On peut donc supposer que JNK et p38, agissant en amont d'AP-1, sont des acteurs importants dans la pathogenèse associée à RSV [122].

JNK et p38 sont connus pour réguler l'expression de plusieurs cytokines en contexte d'infection virale. Par exemple, il a été montré que p38 induisait la production de plusieurs cytokines en réponse au virus de l'Influenza (IV). En effet, il régule, directement ou indirectement, plus de 90 % des gènes induits par l'IV. En réponse au virus, p38 module l'induction de la réponse IFN, puis, plus tardivement, la signalisation des ISG [128]. JNK régule l'expression de CXCL8 suite à l'infection par RSV. Effectivement, en inhibant JNK à

l'aide de l'inhibiteur SP600125, on voit une diminution de la transcription de CXCL8 dépendante d'AP-1 [122]. JNK et p38 régulent CCL5 en réponse à l'IV dans les cellules épithéliales pulmonaires [129]. De plus, l'induction de TNF- $\alpha$  par l'IV H5N1 est dépendante de p38 [130]. L'inhibition de p38 a également un effet antiviral contre l'IV H5N1 et H7N7, principalement en bloquant la production excessive de cytokines pro-inflammatoires. En effet, les souris sont protégées des infections létales causées par l'IV lorsque p38 est inhibé à l'aide de l'inhibiteur SB202190, puisqu'elles ne présentent pas de production excessive de cytokines [128].

La sécrétion de cytokines est régulée de manière temporelle par p38. L'expression d'IL-6 stimulée par le TNF- $\alpha$  dans les AEC est biphasique, c'est-à-dire qu'il y a deux vagues d'expression de l'ARNm d'IL-6, grâce à une régulation stricte dépendant de p38 [131]. D'autres études ont décrit une régulation temporelle similaire. En effet, l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le CXCL8 et la cyclooxygénase (COX)-2 dans les cellules Hela semble nécessiter une oscillation de l'activation de p38 en réponse à une exposition continue à l'IL-1 $\beta$  [132].

D'un autre côté, dans les macrophages, JNK et p38 induisent des cytokines pro-, mais aussi anti-inflammatoires. À la suite de l'activation des TLR, il y a une première phase, la phase précoce, qui induit TNF- $\alpha$ , stimulant une réponse pro-inflammatoire. Par contre, lors de la phase tardive, il y a production d'IL-10, surtout modulée par p38, ce qui stimule une réponse anti-inflammatoire [133]. Effectivement, IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui inhibe l'expression d'IL-6 et de TNF. Étrangement, p38 et MKK3, mais non MKK6, stimulent la production d'IL-10 [134].

#### **2.4.2.2 La régulation de l'infection virale**

L'activation de p38 par plusieurs virus respiratoires, tels l'IV H1N1, le virus Coxsackie B3, le PIV 3, l'adénovirus et RSV, est dépendante du TLR4 ainsi que de MyD88. p38 régule positivement les infections virales respiratoires, puisque lorsqu'il est inhibé à l'aide de l'inhibiteur SB203580, il y a diminution de la réplication de tous ces virus respiratoires [113]. p38 serait donc une bonne cible thérapeutique pour limiter la propagation des virions de RSV

ainsi que l'inflammation excessive qui y est associée. Finalement, la réplication du virus herpes simplex bovin est dépendante de la voie JNK-c-Jun, mais indépendante de p38 et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [135].

### **2.4.2.3 La régulation de l'apoptose**

JNK et p38 jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose via leurs fonctions pro-apoptotiques, mais aussi anti-apoptotiques, selon le type cellulaire ainsi que le stimulus [136-141]. Il a été montré qu'en contexte d'infection virale dans lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, JNK1 joue un rôle dans la survie cellulaire, tandis que JNK2 est impliqué dans l'expansion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [136]. Par ailleurs, une voie de signalisation menant à l'apoptose et impliquant JNK et p38 a été décrite. En effet, la « Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase » (PKR) active ASK1, qui induit l'activation de MKK4 et MKK3/MKK6 par phosphorylation. Ces derniers phosphorylent à leur tour JNK et p38, respectivement, ce qui mène à l'état apoptotique. ASK1 induit également l'apoptose en réponse à différents stimuli [140].

Certains virus induisent des voies de signalisation anti-apoptotiques pour assurer leur réplication. Suite à l'infection par l'Entérovirus 71 (EV71), JNK est activé et induit l'apoptose via la voie « Bcl-2-Associated X Protein » (Bax). D'un autre côté, « Phosphoinositide 3-Kinase » (PI3K) et Akt sont induits par EV71, ce qui mène à la phosphorylation et à la désactivation d'ASK1, limitant l'activation de JNK ainsi que l'apoptose [141]. p38 joue aussi un rôle important dans la prolifération et la survie cellulaire via la voie pro- et anti-apoptotique « B-cell Lymphoma 2 » (Bcl-2) [142]. Par ailleurs, l'induction de p38 par la protéine ICP27 du virus herpes simplex de type 1 entraîne l'apoptose des cellules, tandis que l'activation de JNK mène à l'inhibition de la voie apoptotique [139].

Une étude a montré qu'en réponse à SeV, en plus de former le mito-signalosome, MAVS recrute MKK7 au niveau de la mitochondrie. JNK2 est alors phosphorylée par MKK7 et déclenche l'apoptose. Cette voie de signalisation est cependant indépendante de RIG-I et de MDA5, ce qui est plutôt étonnant sachant qu'il s'agit des deux senseurs d'ARN viral en amont de MAVS. Un senseur inconnu pourrait alors être à l'origine de l'activation de MAVS dans

cette voie de signalisation [118]. D'autres études ont montré que l'apoptose induite par SeV inactivé était dépendante de JNK et p38 [143, 144]. À l'opposé, il y a très peu de données sur l'apoptose en réponse à RSV. On ne sait donc pas si JNK et p38 régulent l'apoptose dans ce contexte.

#### **2.4.2.4 Le rôle de JNK et p38 dans la migration cellulaire**

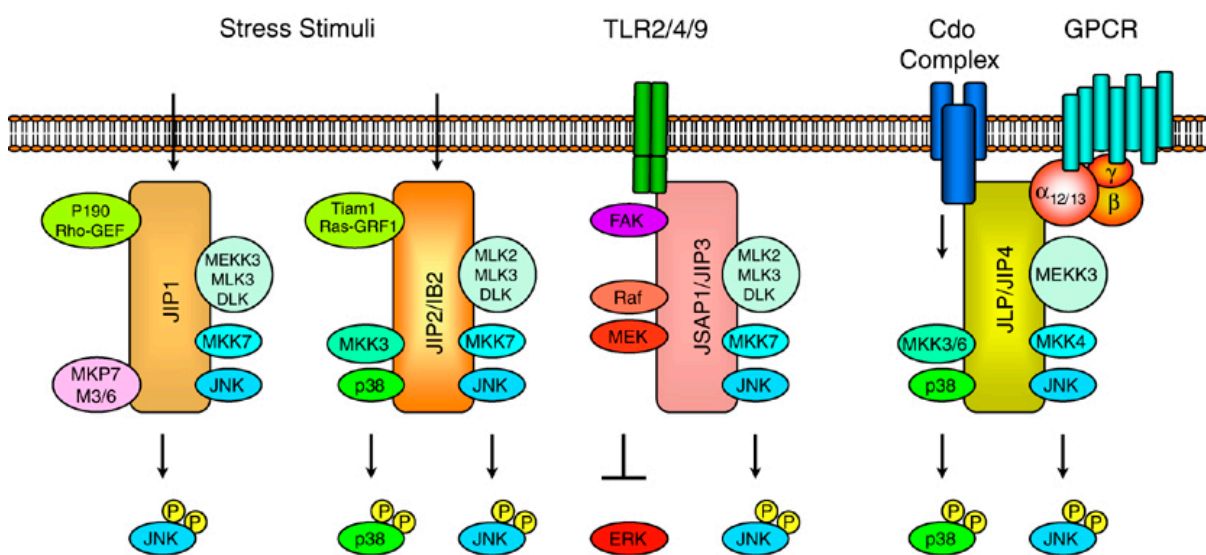
De plus en plus d'études montrent l'implication de JNK et p38 dans la modulation de voies pro-migratoires dans différents contextes [145]. JNK2 régule la migration cellulaire de manière redondante avec JNK1 [146]. Des analyses de qRT-PCR et d'immunoblot ont montré que la « Matrix Metalloproteinase 9 » (MMP-9) est également impliquée dans la migration des cellules épithéliales pulmonaires A549 en réponse à l'IL-1 $\beta$  de manière ERK, p38, JNK et NF- $\kappa$ B-dépendante [147]. D'un autre côté, p38 induit l'accumulation d'ICAM-1 dans les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires infectées par RSV. Cette accumulation entraîne une augmentation de l'adhésion et de la transmigration des neutrophiles [148]. De plus, p38 est impliqué dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium. En effet, RSV induit une perturbation de la membrane épithéliale, définie par une diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER), de manière p38-dépendante [149].

#### **2.4.2.5 La modulation du cycle cellulaire**

Les MAPK sont impliquées dans une multitude de fonctions, dont la régulation du cycle cellulaire [150]. AP-1 n'est pas seulement un facteur de transcription pour des gènes codant pour des cytokines. En effet, via c-Jun, JNK régule la transcription de gènes AP-1-dépendants, comme la cycline D1, qui contrôle le cycle cellulaire [151]. Il a été décrit que JNK2 induit la prolifération des cellules [146]. À l'opposé, p38 régule négativement le cycle cellulaire en stoppant les cellules en phase G<sub>1</sub>/S et G<sub>2</sub>/M, principalement via l'inhibition de cyclines et l'induction des inhibiteurs des « Cyclin-Dependent Kinases » (CDK) [142].

### 2.4.3 Les protéines d'échafaudage des MAPK

Les cascades d'activation des MAPK sont facilitées par des protéines d'échafaudage. Les protéines d'échafaudage facilitent l'activation de certaines voies de signalisation en permettant aux protéines d'accéder facilement à leurs substrats. Elles modulent l'emplacement spatiotemporel, les concentrations locales et les propriétés biochimiques des complexes de protéines qu'elles ciblent [152]. Il existe quatre « JNK-Interacting Proteins » (JIP) : JIP1, JIP2, JIP3 et JIP4 (Figure 5).



**Figure 5. Les différentes protéines d'échafaudage des MAPK.**

JIP1 mène à l'activation de JNK via les MAPKKK MEKK3/MLK3/DLK ainsi que MKK7. JIP2 facilite l'activation de p38 via MKK3, en plus de celle de JNK via MLK2/MLK3/DLK et MKK7. JIP3 induit l'activation de la voie MLK2/MLK3/DLK-MKK7-JNK. Finalement, JIP4 mène à l'activation de p38 en interagissant avec MKK3/MKK6 et p38, et active JNK via MEKK3 et MKK4. Source [153] avec la permission de Nature Publishing Group.

Parmi les JIP, JIP1 est celui qui a été le plus étudié jusqu'à présent. Il s'agit d'une protéine cytoplasmique exprimée principalement dans le cerveau, mais aussi dans les reins, les testicules, les poumons et les muscles chez la souris [154]. JIP1 possède une isoforme : JIP1b. JIP1b est en fait la protéine pleine longueur, et JIP1 est le fruit d'une délétion de 47 acides aminés en C-terminale [155]. JIP1 est nécessaire à l'activation de la voie de signalisation dépendante de JNK via MLK3 et MKK7 [155-157] (Figure 5). L'inhibition de JIP1 chez les

souris déficientes en JIP1 empêche l'activation de JNK et de c-Jun en réponse au stress dans les neurones [155, 158]. Certains JIP peuvent homo- et hétéro-oligomériser. Les fonctions d'échafaudage de JIP1 sont dépendantes de son oligomérisation [159]. Il s'associe aussi à « Plenty of SH3 » (POSH), une autre protéine d'échafaudage de JNK, créant un complexe d'activation de JNK [160]. POSH s'associe aux MLK, ainsi qu'à MKK4, MKK7 et JNK [161]. Le domaine d'association à JNK de JIP1 a servi pour produire plusieurs peptides et petites molécules inhibiteurs de JNK. En effet, ces inhibiteurs bloquent l'interaction entre JIP1 et JNK, ce qui d'inhibe la voie de signalisation de JNK, menant à l'inhibition de la phosphorylation de c-Jun et ATF2 [162-165] ainsi que l'inhibition de cytokines dépendantes d'AP-1, comme l'IL-2, l'IFN $\gamma$  et l'IL-10 [166, 167]. L'activation de la transcription de gènes dépendants d'AP-1 en réponse à l'IL-1 $\beta$  passe par JIP1, puisqu'elle est inhibée lorsque l'expression de JIP1 est bloquée à l'aide de shRNA [167]. JIP1 est donc essentiel pour réguler l'activation ou l'inhibition de la voie JNK-AP-1 menant à la production de cytokines via JIP1 [155, 158, 166, 167]. JIP1 régule aussi la signalisation JNK-dépendante menant à l'apoptose des cellules [157, 158].

JIP2 se ne retrouve que dans le cerveau chez l'humain [168]. À notre connaissance, JIP2 ne possède pas d'isoformes. Les JIP n'interagissent pas seulement avec la voie d'activation de JNK. En effet, en plus d'activer JNK via MKK7, JIP2 joue également un rôle dans l'activation de p38 via MLK3 et MKK3 dans une variété de contextes [169-171] (Figure 5). Les protéines d'échafaudage, ayant des substrats différents, régulent l'activation de différentes fonctions spécifiques. Les différents JIP sont donc impliqués dans différentes fonctions cellulaires. JIP2 lie et active les voies des TLR2 et TLR9 [172].

JIP3 peut aussi être retrouvé dans les cellules pulmonaires [173-175]. JIP3 existe aussi sous une autre forme, « JNK/SAPK-Associated Protein 1 » (JSAP1), dérivée de l'épissage alternatif du même gène [176, 177]. Les différentes isoformes de JIP3 ont différentes spécificités pour leurs ligands. En effet, des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que JIP3 lie MLK-MKK7-JNK, tout comme JIP1 [176]. Cependant, contrairement à JIP3, JSAP1 active la voie JNK en liant MEKK1-MKK4-JNK in vitro [177] (Figure 5). Par conséquent, JIP3 et JSAP1 modulent des fonctions cellulaires distinctes. JIP3 s'associe au TLR4 pour activer la voie JNK en réponse au lipopolysaccharide (LPS) [172] et régule



l'induction de l'apoptose via JNK dans les cellules neuronales de souris [178], tandis que JSAP1 régule la migration cellulaire via JNK et la « Focal Adhesion Kinase » (FAK) [179].

JIP4, étant aussi connu sous le nom de « Protein Highly Expressed in Testis » (PHET) ou « Sperm Surface Protein », est localisé dans les testicules [180, 181]. Le gène *JIP4* code pour au moins trois variants d'épissage alternatif différents, soit JIP4 [182], JLP [183] et « Sperm Associated Antigen 9 » (SPAG9) [184]. Bien qu'il puisse activer JNK via MEKK3 et MKK4, JIP4 lie et active principalement p38 via MKK3/MKK6 suite à son activation par ASK1 [182] (Figure 5). Toutefois, SPAG9 immunoprécipite avec JNK, mais n'interagit pas avec p38 [184]. JLP active la voie JNK en liant MEKK3 et MKK4 également [183]. JIP3 et JIP4 régulent l'apoptose des cellules en liant ASK1 [182].

L'implication des protéines d'échafaudage JIP n'a, à notre connaissance, pas encore été évaluée dans un contexte de réponse immunitaire innée contre des pathogènes, notamment dans le contexte des infections virales.

#### **2.4.4 La régulation négative des voies JNK et p38**

L'expression de JNK et p38 est induite par plusieurs stimuli, mais est aussi régulée par des boucles de rétroaction qui amplifient ou diminuent leur signal. p38 est impliqué dans des boucles de rétrocontrôle complexes et pas encore totalement élucidées, en réponse à des stimuli bactériens. En effet, dans les macrophages stimulés par du LPS ou du peptidoglycane (PGN), p38 induit l'activation de la « Dual Specificity Phosphatase 1 » (DUSP1), étant connue pour déphosphoryler JNK et p38 dans ces conditions. L'activation de DUSP1 est dépendante de p38, mais aussi de son substrat, la « MAPK-Activated Protein Kinase » (MAPKAPK) 2 [185]. Donc, en induisant l'activation de DUSP1, p38 s'autorégule négativement. p38 s'autorégule aussi en diminuant la stabilité de l'ARNm de MKK6 en conditions non stimulées [186].

Des boucles de rétroaction négative peuvent réguler l'activation de JNK via les JIP. En effet, JIP1 et JIP2 s'associent avec la « MAPK Phosphatase » (MKP)-7 et M3/6 (aussi connu sous le nom de MKP-8), inactivant la signalisation de JNK *in vitro* [187]. MKP-7 et M3/6 ont

un domaine homologue qui interagit avec JIP1. Lorsque MKP-7 est lié à JIP1, il inhibe son association avec JNK, empêchant sa phosphorylation et la phosphorylation de c-Jun subséquente. DUSP1, MKP-2, MKP-4, MKP-5 ou PAC1 ne possèdent pas cette région homologue à MKP-7 et M3/6 et n'interagissent pas avec JIP1 [187]. D'autre part, « Vaccinia-Related Kinase 2 » (VRK2) diminue la transcription de gènes dépendants d'AP-1 en liant JIP1, ce qui bloque son association à JNK ainsi que l'activation par phosphorylation de JNK. VRK2 s'associe directement TAK1, MKK7 et JIP1, mais pas JNK. Toutefois, il peut former un complexe incluant les protéines TAK1, MKK7 $\beta$ 1 et JNK [167]. Akt lie aussi JIP1, menant à une réduction de l'apoptose en brisant le complexe d'activation de JNK [188]. En bref, MKP-7, M3/6, VRK2 et Akt inhibent l'activation de c-Jun en interagissant avec JIP1 aux dépens de JNK.

#### **2.4.5 Le lien avec les voies IRF3 et NF- $\kappa$ B**

JNK et p38 ne régulent pas seulement l'activation du facteur de transcription AP-1. Effectivement, de plus en plus d'évidences suggèrent qu'il existe un « cross-talk » entre les voies AP-1, NF- $\kappa$ B et IRF3. De manière intéressante, il a été démontré récemment que la voie TAK1-JNK est aussi impliquée dans la phosphorylation d'IRF3 [189]. Une autre étude a montré que JNK phosphoryle directement IRF3 en réponse au poly (I:C) [116]. En réponse au LPS, ISG54 est dépendant d'IRF3, mais aussi de p38, démontrant un lien entre p38 et IRF3 [190]. À l'opposé, en réponse au virus herpes simplex de type 1, l'inhibition de p38 semble induire l'activation d'IRF3 [191]. On peut supposer que cette contradiction soit expliquée par un mécanisme compensatoire, possiblement via JNK, qui contrebalancerait les conséquences de l'absence de p38. Finalement, il a été suggéré que la voie JNK était aussi impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B via MEKK1, mais cela reste à être confirmé par d'autres études plus récentes, notamment dans le contexte d'une infection virale [192].

### **3. La phosphorylation : un mécanisme de régulation majeur des voies de signalisation antivirales**

Plusieurs modifications post-traductionnelles régulent les voies de signalisation menant aux réponses antivirales et pro-inflammatoires [193]. Compte tenu de l'importance de l'ubiquitination dans la régulation des voies de signalisation antivirales, un effort intensif de recherche a révélé le rôle de plusieurs déubiquitinases, incluant A20, la « Cylindromatosis » (CYLD) et la « Deubiquitinating Enzyme A » (DUBA), dans la régulation négative de la réponse antivirale [194-196]. D'un autre côté, depuis les deux dernières décennies, le rôle des kinases et de la phosphorylation de protéines de signalisation dans la régulation de plusieurs voies menant à la production de l'IFN $\beta$  a été largement documenté. Ainsi, puisque ces voies de signalisation sont toutes activées par des événements de phosphorylation, les phosphatases jouent un rôle clé dans la régulation négative de la réponse autonome immunitaire innée antivirale, qui pourrait être bénéfique dans le contexte de la production excessive de cytokines caractéristique de la pathogenèse associée à RSV, entre autres. Les phosphatases sont déjà connues pour être impliquées dans la régulation négative de l'immunité innée contre les bactéries ou les parasites [197, 198]. Leur rôle spécifique dans la résolution de la réponse antivirale dépendante des RLR attire de plus en plus d'attention.

#### **3.1 Les phosphatases qui régulent les voies IRF3 et NF- $\kappa$ B**

Quelques études récentes ont rapporté le rôle de certaines phosphatases dans la régulation de la réponse antivirale. La « Protein Phosphatase 1 » (PP1) induit l'activation des voies de signalisation en aval de RIG-I et MDA5 en déphosphorylant ceux-ci, menant à leur activation [199]. PP1 inhibe également IRF3 de manière directe en le déphosphorylant aux Ser385 et Ser396 en réponse au TLR et au virus de la stomatite vésiculaire (VSV) [200]. La « Protein Phosphatase 1B » (PPM1B) a récemment été décrite comme régulateur négatif de TBK1 en réponse à une stimulation virale. En effet, PPM1B déphosphoryle TBK1, ce qui inhibe l'activation d'IRF3 dépendante de RIG-I [201]. Des études de surexpression et d'inhibition ont également montré qu'une autre phosphatase, la « Protein Phosphatase 2A »

(PP2A) régulait négativement l'IFN $\beta$  par la voie IRF3 induite en réponse au LPS, au poly (I:C) et à SeV. Effectivement, le « Receptor for Activated C Kinase 1 » (RACK1), une protéine adaptatrice, recrute PP2A au niveau d'IRF3, ce qui forme un complexe. On sait qu'IRF3 est activé par phosphorylation à la suite d'une stimulation virale, comme SeV, par exemple. Par contre, pour limiter la réponse IFN de type I, la formation du complexe permet à PP2A de déphosphoryler IRF3 dans les stades ultérieurs de l'infection [202, 203]. En réponse à l'IV, IRF3 est également directement régulé par MKP-5, qui déphosphoryle IRF3, empêchant son accumulation dans le noyau. Les souris déficientes en MKP-5 sont d'ailleurs résistantes à l'infection par IV grâce à une augmentation de l'activation d'IRF3 et de la production d'IFN de type I concomitante [204]. Finalement, la phosphatase PPM1A déphosphoryle TBK1/IKK $\epsilon$  ainsi que MAVS afin de réguler négativement la réponse antivirale. Par conséquent, les cellules déficientes en PPM1A sont résistantes aux virus à ARN, tandis que la surexpression de PPM1A chez le poisson-zèbre le rend beaucoup plus vulnérable aux infections de virus à ARN [205].

Il est aussi important de mentionner que plusieurs virus ont développé des mécanismes pour limiter leur détection ou la production d'IFN afin d'éviter d'enclencher une réponse antivirale et inflammatoire. Ces mécanismes ciblent parfois des phosphatases afin de moduler la balance phosphorylation/déphosphorylation des voies de signalisation de l'immunité innée. La protéine virale V des Paramyxovirus est associée à l'évasion de la réponse immunitaire innée. Par exemple, les protéines V du virus de la rougeole ainsi que du virus Nipah se lient à PP1, ce qui empêche son attachement à MDA5. La protéine V entre donc en compétition avec MDA5, mais pas avec RIG-I, pour le site catalytique de PP1, empêchant l'activation de MDA5 et des voies de signalisation en aval [206].

Toutefois, aucune phosphatase n'a encore été décrite pour déphosphoryler directement les acteurs de la voie menant à l'activation d'AP-1 dans un contexte d'infection par les Paramyxovirus ou les Pneumovirus. Ces phosphatases restent donc encore à être identifiées.

### **3.2 La phosphatase DUSP1 dans le contrôle d'AP-1**

La phosphatase DUSP1, aussi connue sous le nom de MKP-1, fait partie de la grande famille des DUSP (Tableau II). Les DUSP peuvent être divisés en six sous-groupes principaux, soit les MKP, les « Slingshot Protein Phosphatases », les « Protein Tyrosine Phosphatases Type IVA », les « CDC14 Phosphatases », les « Phosphatase and Tensin Homologues Deleted on Chromosome 10 (PTEN) Protein Phosphatases » et les DUSP atypiques [207]. Les MKP, comme leur nom l'indique, déphosphorylent les MAPK et sont donc impliquées dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires essentielles dépendantes des MAPK. DUSP1 est connu pour déphosphoryler les MAPK ERK, JNK et p38 dans différents contextes [208, 209]. L'inhibition de DUSP1 prolonge l'activation de JNK et p38 [210], notamment dans les macrophages alvéolaires de souris [209].

Tableau II. La classification des DUSP

Sous-groupes	MKP	Slingshot Protein Phosphatases	Protein Tyrosine Phosphatases Type IVA	CDC14 Phosphatases	PTEN Protein Phosphatases	DUSP Atypiques
DUSP	DUSP1	SSH1	PTP4A1	CDC14A	PTEN	DUPD1
	DUSP2	SSH2	PTP4A2	CDC14B	TNS1	DUSP3
	DUSP4	SSH3	PTP4A3	CDKN3	TNS2	DUSP11
	DUSP5			PTPDC1	TPTE	DUSP12
	DUSP6				TPTE2	DUSP13
	DUSP7					DUSP14
	DUSP8					DUSP15
	DUSP9					DUSP18
	DUSP10					DUSP19
	DUSP16					DUSP21
	STYXL1					DUSP22
						DUSP23
						DUSP26
						DUSP28
						EPM2A
						PTPMT1
					RNGTT	
					STYX	

Via la régulation des MAPK, DUSP1 joue un rôle important dans plusieurs cancers. Par exemple, DUSP1 est surexprimé dans les cancers du poumon à non petites cellules (NSCLC) [211], le type de cancer du poumon le plus commun, mais malheureusement aussi le plus réfractaire aux traitements. DUSP1 est constitutivement exprimé dans les cellules NSCLC, ce qui les rend résistantes au cisplatine, un traitement anticancéreux qui induit l'apoptose via l'activation de JNK [212]. DUSP1 est aussi surexprimé dans le cancer du sein, en plus d'ERK, p38 et JNK1. Toutefois, malgré sa surexpression, l'activité de JNK1 est grandement réduite dans ces cellules, potentiellement dû à la forte expression de DUSP1. En inhibant l'activation de JNK1, DUSP1 pourrait donc être responsable de la perte du rôle pro-apoptotique de JNK1 dans les cellules de cancer du sein [213]. Par contre, l'expression de

DUSP1 est inhibée dans la plupart des carcinomes de prostate réfractaires aux traitements [214, 215]. Cette contradiction de l'expression de DUSP1 dans différents cancers montre que l'activité de DUSP1 est spécifique pour chaque type cellulaire.

DUSP1 est aussi connu comme régulateur négatif de l'immunité innée dans plusieurs contextes, notamment dans le contexte des infections bactériennes, en jouant un rôle important dans la production de cytokines. Il a été montré que la production de TNF- $\alpha$  dans les macrophages alvéolaires primaires isolés de souris déficientes en DUSP1 stimulés au LPS était plus rapide et plus robuste que chez les souris contrôles. À l'opposé, la surexpression de DUSP1 dans ces macrophages entraîne une diminution significative de la production de TNF- $\alpha$  induite par le LPS [209]. Il a aussi été démontré que DUSP1 régule négativement le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-10 chez les macrophages de souris après stimulation au LPS [133, 210]. L'inhibition de DUSP1 médiée par le microARN miR429 mène à une augmentation de P-p38 et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 dans les cellules pulmonaires stimulées au LPS [216]. De plus, via l'inhibition de p38 et de la voie JNK-c-Jun, DUSP1 inhibe l'expression de l'IFN $\beta$  en réponse au LPS dans les macrophages. De plus, les macrophages déficients pour DUSP1 induits par le LPS présentent une surexpression de TNF, de CXCL1, de CXCL2, de CCL2, de CCL3 et d'IL10 [217].

Dans un contexte d'allergies, DUSP1 régule négativement l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et CXCL8 dans les cellules épithéliales nasales exposées à des acariens [218]. DUSP1 est aussi induit lorsque les souris sont traitées avec des corticostéroïdes fréquemment prescrits pour les maladies pulmonaires inflammatoires [209]. Les glucocorticoïdes exercent d'ailleurs leurs propriétés anti-inflammatoires en augmentant l'expression de DUSP1 [219-221].

En réponse au TNF- $\alpha$ , DUSP1 régule l'expression de plusieurs cytokines et est responsable de leur expression « oscillatoire ». En effet, l'expression d'IL-6 stimulée par le TNF- $\alpha$  dans les AEC est biphasique grâce à la régulation stricte dépendant de p38 [131], de DUSP1 et de la tristetraproline (TTP). Le modèle proposé est que le TNF- $\alpha$  induit la phosphorylation de p38, ce qui mène à l'expression d'IL-6. Par la suite, p38 induit l'activation de DUSP1, qui déphosphoryle alors p38, ce qui induit l'activation de TTP, qui va alors lier l'ARNm de l'IL-6 et le déstabiliser, entraînant l'arrêt de l'expression d'IL-6. Éventuellement,

DUSP1 est dégradé par le protéasome [222], ce qui réactive p38 et désactive TTP par phosphorylation, menant à une deuxième vague d'expression d'IL-6 [131]. TTP a la capacité de lier non seulement IL-6, CXCL1 et CXCL2, mais aussi CCL2, CCL3, CXCL8, CXCL11, CXCL12, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, IL-12, IL-17, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , etc. [223] L'oscillation de l'expression de cytokines dépendante de DUSP1 a aussi été décrite en réponse à l'IL-1b dans les cellules Hela. Effectivement, l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, CXCL8 et COX-2 nécessite une oscillation de l'activation de p38 en réponse à une exposition continue à l'IL-1 $\beta$ . Cette oscillation est due à DUSP1, via une boucle de rétroaction négative [132]. L'expression du TNF, de CXCL1 et de CXCL2 est aussi régulée par TTP via DUSP1 en réponse au LPS [217].

Nos connaissances sur le rôle de DUSP1 dans un contexte d'infection virale sont beaucoup plus restreintes. Il a été montré que DUSP1 limite la production excessive d'IL-6 et de CXCL8 durant l'infection par Coronavirus [224]. Des résultats similaires ont été observés lors de la stimulation par le poly (I:C) [218]. Deux modèles de virus de la vaccine, une forme atténuée ainsi qu'une forme répliquative du virus (WR), induisent l'activation de DUSP1, menant à une diminution de l'activation de JNK et ERK chez la souris. La réplication de WR est d'ailleurs augmentée chez les souris déficientes en DUSP1, ce qui les rend plus susceptibles à l'infection par WR [225]. Toutefois, à ce jour, l'impact de DUSP1 sur l'établissement de la réponse immunitaire innée dans le cadre des infections par les Paramyxovirus ou les Pneumovirus n'a jamais été étudié.



## Problématique

Afin d'établir une intensité et une durée idéale pour combattre l'infection sans générer d'effets secondaires indésirables, la réponse de l'hôte doit être régulée de manière très stricte grâce à de nombreux régulateurs positifs et négatifs. Bien que les mécanismes menant à l'établissement de cette réponse soient bien définis, nos connaissances des mécanismes permettant la résolution de cette réponse sont toutefois encore très limitées. De plus, ces voies de signalisations impliquées dans la réponse de l'hôte contre les virus respiratoires sont aussi dérégulées dans les maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques. En faisant la lumière sur la régulation négative des réponses antivirale et pro-inflammatoire, nous serons en mesure de manipuler ces mécanismes, non seulement pour la résolution des infections virales, mais aussi pour le traitement de diverses maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes. Étant donné la grande importance des protéines kinases et des processus de phosphorylation dans l'activation des cascades de signalisation conduisant à l'immunité innée antivirale, il devient sans aucun doute pertinent d'étudier le rôle potentiel des protéines phosphatases. Certaines phosphatases ont été décrites comme étant des régulateurs négatifs des voies NF- $\kappa$ B et IRF3. Toutefois, à ce jour, aucune phosphatase n'est connue pour réguler la voie AP-1 dans un contexte d'infection par RSV et SeV.

La phosphatase DUSP1 est connue comme étant un modulateur de l'immunité innée en régulant négativement la voie d'activation du facteur de transcription AP-1 dans le contexte des infections bactériennes et plus récemment dans certaines infections virales. En nous basant sur les connaissances d'aujourd'hui, notre hypothèse est que **la phosphatase DUSP1 joue un rôle dans la régulation de la défense de l'hôte contre RSV et SeV via la voie de signalisation dépendante de JNK et p38**. Trois objectifs spécifiques ont été déterminés pour tester cette hypothèse. Le premier était de **confirmer si DUSP1 inhibe l'activation de JNK et p38 pendant l'infection par RSV et SeV**. Le deuxième consistait à **déterminer l'impact de DUSP1 dans les réponses pro-inflammatoire et antivirale dépendante de JNK et p38 lors de l'infection par RSV et SeV**. Le troisième était de **déterminer si DUSP1 régule les mécanismes de dommages/réparations tissulaires pendant l'infection par RSV et SeV**.

## Résultats

### **4. DUSP1 regulates apoptosis and cell migration, but not the JIP1-protected cytokine response, during Respiratory Syncytial Virus and Sendai Virus infection**

Article diffusé en prépublication en libre-accès : *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/163360>

- 14 juillet 2017.

Article publié avec comité de lecture dans *Scientific Reports*.

- 12 décembre 2017.

#### **4.1 Auteurs : liste**

Alexa C. Robitaille, Elise Caron, Nicolas Zucchini, Espérance Mukawera, Damien Adam, Mélissa K. Mariani, Anaïs Gélinas, Audray Fortin, Emmanuelle Brochiero et Nathalie Grandvaux.

#### **4.2 Contribution des auteurs**

Les résultats présentés dans l'article ci-dessous découlent des travaux réalisés par différents co-auteurs selon la répartition indiquée ci-dessous.

Le design et l'analyse des expériences ont été réalisés par Alexa Robitaille, sous la supervision de Dre Nathalie Grandvaux. Dr Nicolas Zucchini a contribué au design et à l'analyse des données préliminaires des Figures 1, 2A-C et 3. Dr Damien Adam et Dre Emmanuelle Brochiero ont contribué au design et à l'analyse de la Figure 8.

Les expériences de l'ensemble des figures ont été réalisées par Alexa Robitaille, avec l'aide technique d'Elise Caron et d'Anaïs Gélinas pour les expériences d'immunoblot et d'immunoprécipitation et d'Espérance Mukawera pour la mise au point des expériences de cytométrie en flux, à l'exception des analyses par qRT-PCR, qui ont été réalisées par Espérance Mukawera, Mélissa Mariani et Audray Fortin et la microscopie en direct pour les analyses de migration cellulaire, qui a été réalisée par Dr Damien Adam.

L'article a été rédigé par Alexa Robitaille et Dre Nathalie Grandvaux et approuvé par tous les co-auteurs.

## 4.3 Article

### **DUSP1 regulates apoptosis and cell migration, but not the JIP1-protected cytokine response, during Respiratory Syncytial Virus and Sendai Virus infection**

**Alexa C. Robitaille<sup>1,2</sup>, Elise Caron<sup>1</sup>, Nicolas Zucchini<sup>1,3</sup>, Espérance Mukawera<sup>1</sup>, Damien Adam<sup>1,4</sup>, Mélissa K. Mariani<sup>1</sup>, Anaïs Gélinas<sup>1,3</sup>, Audray Fortin<sup>1</sup>, Emmanuelle Brochiero<sup>1,4</sup> and Nathalie Grandvaux<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> CRCHUM - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 900 rue Saint Denis, Montréal, H2X 0A9, Qc, Canada

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

<sup>4</sup> Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

\* Corresponding author: [nathalie.grandvaux@umontreal.ca](mailto:nathalie.grandvaux@umontreal.ca); Tel.: (+1) 514-890-8000 ext. 35292

**Keywords:** DUSP1, JIP1, JNK, p38, migration, apoptosis, Respiratory Syncytial Virus.

**Running title:** Role of DUSP1 in the antiviral defense against RSV and SeV.

### 4.3.1 Abstract

The host antiviral response involves the induction of interferons and proinflammatory cytokines, but also the activation of cell death pathways, including apoptosis, to limit viral replication and spreading. This host defense is strictly regulated to eliminate the infection while limiting tissue damage that is associated with virus pathogenesis. Post-translational modifications, most notably phosphorylation, are key regulators of the antiviral defense implying an important role of protein phosphatases. Here, we investigated the role of the dual-specificity phosphatase 1 (DUSP1) in the host defense against human respiratory syncytial virus (RSV), a pathogenic virus of the *Pneumoviridae* family, and Sendai virus (SeV), a model virus being developed as a vector for anti-RSV vaccine. We found that DUSP1 is upregulated before being subjected to proteasomal degradation. DUSP1 does not inhibit the antiviral response, but negatively regulates virus-induced JNK/p38 MAPK phosphorylation. Interaction with the JNK-interacting protein 1 scaffold protein prevents dephosphorylation of JNK by DUSP1, likely explaining that AP-1 activation and downstream cytokine production are protected from DUSP1 inhibition. Importantly, DUSP1 promotes SeV-induced apoptosis and suppresses cell migration in RSV-infected cells. Collectively, our data unveil a previously unrecognized selective role of DUSP1 in the regulation of tissue damage and repair during infections by RSV and SeV.

### 4.3.2 Introduction

Respiratory syncytial virus (RSV) belongs to the *Pneumoviridae* family of large enveloped negative-sense ssRNA viruses that includes important human pathogens<sup>1,2</sup>. RSV is a leading cause of acute lower respiratory tract infections associated with morbidity and mortality in infants, children and elderly, but also adults of all-age with a compromised immune system, cardiopulmonary diseases or following transplantation<sup>3,4</sup>. The capacity of the host to mount an appropriate antiviral defense aimed at limiting virus replication and spreading is critical to determine the outcome of the infection. As a consequence, the inability of the host to sustain an antiviral response leads to failure in eradicating the infection. Conversely, uncontrolled duration or intensity of the response is harmful to the host and is associated with the development of virus-associated pathogenesis, chronic inflammatory diseases and various autoimmune diseases<sup>5,6</sup>. Therefore, these responses need to reach the ideal intensity and duration for efficient fighting of the infection while limiting tissue damage and promote tissue repair<sup>7</sup>. To this aim, the various components of the host antiviral defense, including the transcriptional induction of interferons (IFNs) and proinflammatory cytokines and chemokines, but also the activation of cell death pathways, such as apoptosis, are subjected to stringent regulation by both positive and negative mechanisms<sup>8,9</sup>.

Upon virus entry and sensing by the cytosolic pathogen recognition receptors (PRRs) retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA-5), the mitochondrial membrane-associated adaptor (MAVS) coordinates multiple signalling pathways ultimately leading to the activation of the transcription factors IFN regulatory factors (IRF) 3/7, Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and Activator Protein 1 (AP-1)<sup>10-12</sup>. Activation of IRF3 relies on a complex set of phosphorylations mainly mediated by the TANK-binding kinase 1 (TBK1)/ I $\kappa$ B kinase epsilon (IKK $\epsilon$ ) kinases<sup>13-17</sup>. NF- $\kappa$ B, mainly p65/p50, activation during SeV and RSV infections occurs through I $\kappa$ B kinase (IKK)-dependent phosphorylation of the NF- $\kappa$ B inhibitor protein I $\kappa$ B $\alpha$  and of the p65 subunit<sup>18,19</sup>. The signaling cascade leading to AP-1 activation is more elusive, but ultimately results in the phosphorylation of the nuclear Activating Transcription Factor 2 (ATF-2) and c-Jun subunits by JNK and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs)<sup>10,20,21</sup>. The activation of these transcription factors promotes the transcription of early antiviral genes, type I/III IFNs and

proinflammatory cytokines and chemokines<sup>12,22,23</sup>. In response to IFNs, hundreds of interferon-stimulated genes (ISGs) are induced to limit virus replication through enhancement of virus detection and innate immune signaling, cytoskeleton remodelling, inhibition of protein translation, induction of apoptosis, amongst other antiviral functions<sup>24-26</sup>. These same PRRs have also been shown to activate IFN-independent cell death pathways, including apoptosis<sup>8</sup>.

Post-translational modifications (PTMs), including phosphorylation, ubiquitylation and acetylation, of signal transduction proteins involved in the pathways engaged downstream of virus sensing are crucial to reach a fine-tuned regulation of the innate immune response<sup>27</sup>. In light of the very well documented importance of phosphorylation PTMs in the regulation of the antiviral response, the protein phosphatases negatively regulating the signaling events have started to be identified. The exact role of the Ser/Thr protein phosphatase 1 (PP1) in the antiviral response remains elusive as PP1 $\alpha$  and PP1 $\gamma$  were found to dephosphorylate MDA-5 and RIG-I leading to their activation<sup>28</sup>, while they were also described to be responsible for the dephosphorylation of key C-terminal phosphoresidues of IRF3 leading to its inhibition<sup>29</sup>. Most likely reflecting the complexity of IRF3 regulation through phosphorylation at multiple C-terminal phosphoacceptor sites, two other phosphatases, the Ser/Thr protein phosphatase 2 (PP2A) and MAPK phosphatase (MKP) 5, dephosphorylate IRF3 to terminate its activation<sup>30-32</sup>. The Ser/Thr protein phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-dependent (PPM) 1B acts as a TBK1 phosphatase to inhibit IRF3 activation, while PPM1A targets both TBK1/IKK $\epsilon$  and MAVS for dephosphorylation to negatively regulate the antiviral response<sup>33,34</sup>.

In the present study, we sought to address the role of the MKP-1/DUSP1 dual phosphatase (referred to thereafter as DUSP1) in the regulation of the host-defense against RSV and Sendai virus (SeV), a model paramyxovirus that is currently evaluated as a replication-competent backbone for the development of an RSV vaccine<sup>3</sup>. We demonstrate that DUSP1 is a negative regulator of RSV- and SeV-induced JNK/p38 MAPK phosphorylation. However, this function is neither linked to the inhibition of the antiviral response nor to the induction of a cytokine and chemokine response elicited during virus infection. Interestingly, we found that interaction of JNK by the JNK interacting protein (JIP) 1 scaffold protein, previously shown to be critical for AP-1 and downstream cytokine

production specifically, protects JNK from dephosphorylation by DUSP1. Although we confirmed that a JNK/p38 signalling module is involved in the induction of virus-induced apoptosis, our data suggests that DUSP1 has a pro-apoptotic function independently of JNK and p38 during SeV infection. Finally, we found that DUSP1 dampens cell migration during RSV infection. Altogether, these findings point to a previously unrecognized role of DUSP1 in functions that have an impact on virus-associated tissue damage and repair.

### **4.3.3 Results**

#### **4.3.3.1 Induction of DUSP1 during SeV and RSV infection.**

To first assess a potential function of DUSP1, we analyzed DUSP1 expression during the course of SeV and RSV infection in A549 cells by immunoblot. DUSP1 was induced by about 4 fold at 6 h of RSV infection and was returned to basal levels at 24 h post-infection (**Figure 1A**). DUSP1 steady state levels remained unchanged during SeV infection (**Figure 1A**). Because DUSP1 turnover was previously reported to be affected by the ubiquitin-proteasome pathway<sup>35</sup>, we further analyzed DUSP1 levels during SeV and RSV infection in the presence of the 26S proteasome inhibitor MG132. In the presence of MG132, induction of DUSP1 is detectable in both infections and the overall DUSP1 levels were markedly increased compared to control cells (**Figure 1B**). These results imply that DUSP1 protein levels are induced in response to SeV and RSV infection and that DUSP1 is subjected to proteasome-mediated degradation.

#### **4.3.3.2 DUSP1 does not affect SeV and RSV replication**

Next, we sought to determine whether DUSP1 belongs to the numerous negative regulators of the antiviral response induced in response to virus infections<sup>9,36</sup>. First, because of their importance in the control of the IFN-mediated antiviral defense, we evaluated whether DUSP1 has an impact on the signaling cascades leading to NF- $\kappa$ B and IRF3 activation. Considering previous characterization of NF- $\kappa$ B activation in the context of RSV infection<sup>37</sup>,



I $\kappa$ B $\alpha$ -S32 and p65-S536 phosphorylation were analyzed. Activation of IRF3 was monitored through detection of IRF3-S396 phosphorylation<sup>38</sup>. Ectopic expression of DUSP1 in A549 cells did not alter I $\kappa$ B $\alpha$ , p65 or IRF3 phosphorylation profiles observed during the course of SeV (**Figure 2A and B**) or RSV infection (**Figure 2C**), showing that DUSP1 does not play a role in the regulation of these defense pathways. Additionally, ectopic expression of DUSP1 in A549 cells neither significantly altered SeV N mRNA levels measured by qRT-PCR (**Figure 2D top panel**) nor the *de novo* production of RSV virions quantified by plaque assay (**Figure 2D bottom panel**). Consistently, RNAi-mediated silencing of DUSP1 did not alter the capacity of RSV to replicate in A549 cells (**Figure 2E**). Together these data indicate that DUSP1 does not negatively regulate the capacity of the cell to mount an antiviral response to restrict RSV or SeV replication.

#### 4.3.3.3 DUSP1 inhibits RSV- and SeV-induced JNK and p38 phosphorylation

Because DUSP1 preferentially dephosphorylates JNK and p38 in a variety of inflammatory contexts<sup>39,40</sup>, we next sought to evaluate the role of DUSP1 in the negative regulation of RSV- and SeV-induced JNK and p38 activation. First, we monitored the effect of ectopically expressed DUSP1 on the SeV- and RSV-induced JNK T183/Y185 and p38 T180/Y182 phosphorylation in A549 cells. As expected, immunoblot analysis revealed that SeV (**Figure 3A and B**), and to a lesser extent RSV (**Figure 3C**), induce JNK and p38 phosphorylation. Importantly, DUSP1 expression abrogates JNK and p38 phosphorylation (**Figure 3A-C**). Subsequently, we confirmed the role of DUSP1 through analysis of the impact of DUSP1 silencing on the profile of virus-induced JNK and p38 phosphorylation. Immunoblot analysis confirmed the efficiency of DUSP1 silencing in A549 cells throughout the course of SeV and RSV infection (**Figure 4**). Consistent with a role of DUSP1 in the dephosphorylation of JNK and p38, we observed a marked increase of JNK and p38 phosphorylation in the absence of DUSP1 during SeV (**Figure 4A**) and RSV infection (**Figure 4B**). Altogether, these observations reveal a critical role of DUSP1 in the negative regulation of JNK and p38 activation during RSV and SeV infection.

#### **4.3.3.4 Interaction with JIP1 protects JNK from DUSP1 dephosphorylation**

Scaffolding proteins of the JIP family interact with distinct pools of JNK to specifically place them next to their upstream activators and downstream substrate mediating specific functional pathways<sup>41,42</sup>. Therefore, we aimed to investigate the role of JIP proteins in RSV- and SeV-induced JNK activation and regulation by DUSP1. The JIP family is composed of 4 members, JIP1-4, with distinct expression profiles. Here, we assessed the role of JIP1 and JIP3 in A549 cells based on previous reports indicative of their expression in lung cells<sup>43-46</sup>. In contrary, JIP2 was shown to be restricted to human brain<sup>47</sup> and human JIP4 was found only in testis<sup>48,49</sup>. First, we tested the interaction between JNK and JIP1 or JIP3 during SeV and RSV infection. Ectopically expressed JIP1 coimmunoprecipitated with endogenous JNK, both in uninfected and SeV- and RSV-infected cells (**Figure 5A**). By contrast, JIP3 did not interact with JNK (**Figure 5A**). Since we demonstrated the existence of a JIP1/JNK complex, we examined the role of JIP1 in the regulation of DUSP1 dephosphorylation during SeV and RSV infection. A549 cells were cotransfected with JIP1 together with empty or DUSP1-expressing constructs before infection with SeV (**Figure 5B**) or RSV (**Figure 5C**). Confirming our finding (**Figure 3**), ectopic expression of DUSP1 resulted in inhibition of SeV- and RSV-induced JNK phosphorylation (**Figure 5B and C**). Importantly, when JIP1 was coexpressed with DUSP1, the levels of phosphorylated JNK was increased 5.9 and 4 times compared to cells transfected with DUSP1 only during SeV and RSV infection, respectively (**Figure 5D**). Collectively, these data demonstrate that JIP1 interacts with JNK and that recruitment of JNK by JIP1 prevents dephosphorylation by DUSP1 during SeV and RSV infection.

#### **4.3.3.5 AP-1 and downstream cytokine production elicited during infection are protected from DUSP1-mediated inhibition of JNK and p38**

JIP1 is essential for the activation of the JNK/c-Jun axis and downstream AP-1-dependent cytokine expression<sup>50-53</sup>. A main function of JNK and p38 in the host defense against virus infection is to regulate the activation of AP-1 (ATF-2/c-Jun) that participates in the enhanceosome structure controlling IFN $\beta$  expression and contributes to the regulation of proinflammatory cytokine expression<sup>10,20,21</sup>. The observation that JIP1 prevents JNK from

being dephosphorylated by DUSP1 suggests a model in which AP-1-dependent functions would be protected from the negative regulation of DUSP1 during the infection. To confirm that JNK/p38 were involved in virus-induced AP-1 activation and downstream cytokine expression, A549 cells were infected with SeV in the absence or presence of JNK (SP600125) and p38 (SB203580) inhibitors. Immunoblot analysis showed that inhibition of JNK and p38 significantly decreased the levels of phosphorylated c-Jun and ATF-2 (**Figure 6A**). Accordingly, inhibition of JNK and p38 significantly impaired the induction of IFN $\beta$ , CCL2, CXCL8 and IL-6 by SeV, quantified using Luminex-based assays (**Figure 6D and Supplemental Figure 1A**). These results confirmed the role of the JNK/p38-AP-1 signaling cascade in the regulation of SeV-mediated cytokine induction and therefore prompted us to evaluate the impact of ectopic expression of DUSP1 on this pathway. Although ectopic expression of DUSP1 prevents JNK and p38 phosphorylation, SeV- and RSV-induced phosphorylation of c-Jun and ATF-2 remained similar to control cells (**Figure 6B and C**). Analysis of the expression profile of a panel of 48 cytokines using Luminex-based multiplex assays during SeV infection revealed that none of them were significantly altered following DUSP1 ectopic expression (**Figure 6E and Supplemental Figure 1B**). Additionally, silencing of DUSP1 did not affect the levels of IFN $\beta$ , CCL2, CCL5, CXCL8 and IL-6 induced by SeV (**Figure 6F and Supplemental Figure 1C**). Measurement of SeV-induced *IFNB*, *CXCL8* and *CCL2* mRNA levels revealed no impact of DUSP1 ectopic expression, excluding a role of DUSP1 in the transcriptional regulation of cytokines (**Supplemental Figure 2**). Similar results were observed during RSV infection, with silencing of DUSP1 having no impact on the induction of IFN $\beta$ , CCL2, CCL5, CXCL8 and IL-6 (**Figure 6G**). Altogether these observations point to a selective role of DUSP1 in the negative regulation of JNK and p38 during SeV and RSV infection, leaving the AP-1 pathway and downstream cytokine production intact.

#### **4.3.3.6 DUSP1 promotes SeV-induced apoptosis independently of JNK/p38 inhibition.**

JNK/p38 MAPK pathways are also known to play a critical role in the regulation of apoptosis, being either pro- or anti-apoptotic depending on the context<sup>54-59</sup>. A MAVS/JNK

pathway has been shown to be indispensable for SeV to induce apoptosis<sup>60,61</sup>. Therefore, we sought to assess the impact of DUSP1 on the JNK/p38-dependent apoptosis triggered by SeV. A549 cells were transfected with siCtrl or siDUSP1 followed by treatment with DMSO (vehicle) or SP600125 and SB203580 to inhibit JNK and p38 before SeV infection. Quantification of Annexin V<sup>+</sup> cells, corresponding to early and late apoptosis, was performed by Flow cytometry analysis of Annexin V/PI stained cells (**Figure 7A**). Confirming a moderate role of JNK/p38 in SeV-induced apoptosis, inhibition of JNK/p38 reduced the number of Annexin V<sup>+</sup> cells by 12 %. Unexpectedly, DUSP1 silencing also similarly decreased SeV-induced apoptosis by 10 %. Importantly, when DUSP1 silencing and JNK/p38 inhibition were combined, SeV-induced apoptosis was decreased by 23 %, showing an additive effect of the two pathways. SeV-induced apoptosis involves the intrinsic pathway leading to caspase 9 and 3 activation<sup>62</sup>. Therefore, to confirm the impact of JNK/p38 inhibition and/or DUSP1 silencing on SeV-induced apoptosis, caspase 9 and 3 cleavage was monitored by immunoblot. Confirming the results of Annexin V, both inhibition of JNK and p38 and silencing of DUSP1 significantly impaired SeV-induced caspase 3 cleavage (**Figure 7B**). Additionally, caspase 9 cleavage that was induced following SeV infection confirming the engagement of the intrinsic pathway, was reduced in the absence of DUSP1 compared to control cells (**Figure 7B**). These findings confirmed that a JNK/p38 signaling module is involved in the induction of apoptosis during SeV infection, but they also argue against a negative regulation of this pathway by DUSP1. Rather, the observations support the hypothesis that DUSP1 is required for induction of the intrinsic apoptotic pathway independently of JNK and p38.

#### **4.3.3.7 DUSP1 negatively regulates cell migration during RSV infection.**

In contrast to SeV, RSV does not induce significant apoptosis at early time of infection (<sup>63</sup> and data not shown) when DUSP1 dephosphorylates JNK/p38. This prompted us to evaluate the role of DUSP1 in alternative functions during RSV infection. Compelling evidence has implicated JNK/p38 in the positive regulation of cell migration in several cell types<sup>64</sup>. Phenotypic observation of A549 cells during RSV infection following DUSP1

silencing showed obvious formation of pseudopods that were not observed in control cells (**Supplementary Movie 1**). This pointed to a propensity of infected cells to stretch out and migrate in the absence of DUSP1. To investigate the role of DUSP1 in cell migration during RSV infection, 2D cell migration dynamics was assessed by single-cell tracking using time-lapse video-microscopy in subconfluent A549 cell cultures either left uninfected or infected with RSV following siCtrl or siDUSP1 transfection (**Supplementary Movie 1**). As hypothesized, cell trajectories and migration rates were altered following DUSP1 silencing. In the absence of DUSP1, RSV-infected cells were migrating further from their origin compared to control cells that rather adopted a trajectory in circles around their point of origin (**Figure 8**). These observations demonstrate a critical negative role of DUSP1 in the regulation of cell migration during RSV infection.

#### 4.3.4 Discussion

DUSP1 is expressed in various cell types and tissues and mainly acts as a critical negative regulator shaping the duration, magnitude and spatiotemporal profile of p38 and JNK MAPKs, and to a lesser extent ERK, activation following physiological and pathological stimuli <sup>65</sup>. As such, DUSP1 has been extensively shown to negatively regulate the innate immune anti-bacterial defense and the cellular response to allergens <sup>66,67</sup>. In these contexts, DUSP1 mainly inhibits proinflammatory cytokine expression <sup>40,68-73</sup>. The role of DUSP1 in the innate response to virus infection is far less known and, to our knowledge, was not previously assessed in the context of infection by RSV or SeV.

In the present study, we show that DUSP1 negatively regulates p38 and JNK phosphorylation induced by SeV and RSV (**Figure 3 and 4**). Analysis of virus replication, of the NF- $\kappa$ B and IRF3 signaling pathways and of the induction of IFNs levels excluded a role of DUSP1 in the negative regulation of the antiviral defense (**Figure 2 and 6**). The observation that pharmacological inhibition of JNK/p38 MAPKs during SeV infection significantly decreased downstream ATF-2/c-Jun activation and cytokine induction (**Figure 6A and D**) confirmed the previously documented existence of a JNK-p38/AP-1 signaling axis critical for virus-induced cytokine production <sup>10,20,21</sup>. Unexpectedly, DUSP1-mediated inhibition of

JNK/p38 phosphorylation had no effect on downstream phosphorylation of ATF-2/c-Jun or on the levels of a wide panel of cytokines elicited during infection (**Figure 6**). We hypothesized that this observation might reflect the existence of different subsets of JNK segregated through the interaction with specific scaffold proteins. In the MAPK signaling modules involving JNK, members of the JIP family of scaffold proteins selectively enhance specific JNK-dependent functions by interacting with and linking the upstream kinases to JNK activation<sup>41,42</sup>. In our experimental model, we showed that JNK interacts with JIP1, but not with JIP3, at basal levels and during infection (**Figure 5A**). Importantly, we found that the JIP1/JNK interaction dampens the capacity of DUSP1 to dephosphorylate JNK (**Figure 5B-D**). Compelling evidence demonstrates that JIP1 is essential for the activation of the JNK/AP-1 axis that controls cytokine expression<sup>50-53</sup>. Although we cannot exclude other mechanisms, it is reasonable to speculate that during SeV and RSV infection, the sequestration of JNK through molecular interaction with JIP1 protects JNK and downstream AP-1 and cytokine response from DUSP1 negative regulation (**Figure 6**). Further studies will be required to fully address this model. Previous reports have shown that interaction with JIP1 leads to the retention of JNK in the cytoplasm<sup>43,74</sup>. DUSP1 is a nuclear phosphatase<sup>75,76</sup> and therefore predominantly dephosphorylates JNK and p38 in the nucleus<sup>77</sup>. It is thus very likely that retention of JNK in the cytoplasm by JIP1 contributes to protect JNK from DUSP1 dephosphorylation. Our results differ from previous reports showing DUSP1-dependent inhibition of proinflammatory cytokine expression following challenge with the viral dsRNA mimetic poly I:C, coronavirus and vaccinia virus infection<sup>71,78,79</sup>. Additionally, DUSP1 was shown to enhance vaccinia virus replication<sup>79</sup>. Thus, DUSP1 appears to differentially regulate the cytokine response and virus replication depending on the virus. One might speculate that the JIP1/JNK interaction might be differently affected upon infection by distinct viruses. While we did not observe changes of the JIP1/JNK complex during SeV and RSV infection, other viruses may interfere with this interaction thereby making JNK available for dephosphorylation by DUSP1 to negatively regulate downstream cytokine release. Although to date no virus was reported to dissociate the JIP1/JNK complex, it is interesting to note that Vaccinia virus-encoded B1R kinase interacts with JIP1 leading to increased binding of JNK to JIP1 and downstream activation of c-Jun<sup>80</sup>.

Amongst alternative functions driven by JNK and p38 MAPK pathways are the regulation of cell proliferation and apoptosis<sup>81</sup>. Cell cycle analysis during SeV and RSV infection following ectopic expression or silencing of DUSP1 failed to demonstrate a role of DUSP1 in cell proliferation (data not shown). Instead, we found that DUSP1 is required for induction of the intrinsic apoptotic pathway triggered during SeV infection (**Figure 7B**). Confirming previous reports<sup>60,82,83</sup>, we also found that a JNK/p38 pathway contributes to SeV-induced apoptosis (**Figure 7A**). The observation that inhibitions of DUSP1 and JNK/p38 have additive effect on the negative regulation of SeV-induced apoptosis (**Figure 7**) strongly hints at a model in which DUSP1 regulates virus-induced apoptosis in a JNK/p38-independent manner. Further studies will be required to challenge this model. Additionally, this also argues toward a model in which the JNK/p38 pro-apoptotic function is also protected from DUSP1 dephosphorylation, possibly through the observed JNK/JIP1 interaction. This model is consistent with the fact that MAVS-MKK7-JNK defines a pro-apoptotic pathway during SeV infection and that JIP1 specifically functions in the JNK pathway by tethering MLK3 (MAPKKK), MKK7 (MAPKK) and JNK<sup>60,74</sup>. Moreover, the JIP1/JNK axis has also been shown to be pro-apoptotic in neurons exposed to stress<sup>51,84</sup>. RSV does not induce significant apoptosis at early time of infection (<sup>63</sup> and data not shown) when DUSP1 dephosphorylates JNK/p38, but DUSP1 silencing resulted in formation of pseudopods that were not observed in controls cells (**Supplementary Movie 1**). In the quest to characterize DUSP1-dependent JNK and p38 functions, we thus assessed the impact of DUSP1 on cell migration during RSV infection. Indeed, accumulating evidence implicates JNK and p38 in pro-migratory functions in various contexts<sup>64</sup>. Here, we demonstrate that in the absence of DUSP1, cell migration of RSV infected cells was highly enhanced (**Figure 8**) pointing to a critical role of DUSP1 in the negative regulation of JNK/p38-mediated cell migration during RSV infection. In contrary to RSV, SeV induces high levels of apoptosis at early time of infection, which prevented an unbiased analysis of the migration parameters. Regulation of apoptosis and cell migration are part of the arsenal of the host response that have the potential to not only influence the outcome of virus spreading, but also the extent of virus-induced tissue damage and repair thereby contributing to pathogenesis<sup>7,85</sup>. The implication of the observed DUSP1-mediated regulation of apoptosis and cell migration in SeV and RSV spreading can be excluded based on the lack of effect of DUSP1 ectopic expression or silencing on virus replication (**Figure 2**).

Induction of apoptosis and inhibition of cell migration by DUSP1 rather suggests a role in the induction of cell damage and inhibition of tissue repair and thereby in virus-induced pathogenesis.

Altogether our results suggest a model in which DUSP1 is a negative regulator of important host mechanisms that limit tissue damage and promote tissue repair. An exaggerated cytokine response can also contribute to host self-inflicted damages and thereby contribute to virus-induced pathogenesis<sup>86</sup>. We found that the cytokine response remains intact upon manipulation of DUSP1 expression due to protection by the interaction of JNK with JIP1 (**Figure 5A**). The observation that JIP1/JNK interaction prevents a potential negative regulation of the cytokine response by DUSP1 opens avenues for specific therapeutic targeting. Indeed, one can hypothesize that inhibition of the JIP1/JNK interaction might restore DUSP1-dependent inhibition of the AP-1/cytokine axis during the infection, while leaving other JIP1-independent JNK functions unaffected. Further studies will be required to evaluate this possibility. The JIP1/JNK interaction has long been considered an interesting specific target and this led to the development of small molecules and peptides that inhibit the interaction between JNK and JIP1 and efficiently block JNK activity toward selective substrates, including ATF-2 and c-Jun<sup>87-90</sup>. Alternatively, direct inhibition of DUSP1<sup>91,92</sup> might be a strategy to improve tissue homeostasis, by reducing virus-induced apoptosis and restoring cell migration, during virus infection.

## **4.3.5 Materials and Methods**

### **4.3.5.1 Cell culture**

A549 cells (American Type Culture Collection, ATCC) were grown in Ham F12 medium (GIBCO) and Vero cells (ATCC) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO). Both media were supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (HI-FBS, GIBCO) and 1 % L-Glutamine (GIBCO). Cultures were performed without antibiotics and were tested negative for mycoplasma contamination (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza) every 2 months.



#### 4.3.5.2 Infections

Subconfluent monolayers (90 % confluency) of A549 cells were infected with Sendai virus (SeV, Cantell strain, Charles River Laboratories) at 5-40 hemagglutinin units (HAU)/10<sup>6</sup> cells as indicated in serum free medium (SFM). At 2 h post-infection, the medium was supplemented with 10 % HI-FBS and the infection pursued for the indicated time. Infection with RSV A2 (Advanced Biotechnologies Inc), amplified and purified as described in <sup>37</sup>, was performed at a MOI of 1-3 as indicated in medium containing 2 % HI-FBS. Where indicated, A549 were pretreated with 5  $\mu$ M MG132 (Calbiochem) or DMSO (vehicle, Sigma-Aldrich) for 1 h before infection. Pretreatment with 10  $\mu$ M SB203580 and 10  $\mu$ M SP600125 (Invivogen) or the corresponding vehicle DMSO was performed for 30 min prior to infection.

#### 4.3.5.3 SDS-PAGE and immunoblot

The procedures used for preparation of Whole Cell Extracts (WCE), resolution by SDS-PAGE electrophoresis and immunoblot was fully detailed in <sup>93</sup>. The following primary antibodies were used in this study: anti-MKP-1/DUSP1 (M18, #sc-1102), anti- $\alpha$ -tubulin (B-7, #sc-5286) and anti-NF $\kappa$ B p65 (C-20, #sc-372) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Anti-phosphoT183/Y185 SAPK/JNK (G9, #9255), anti-SAPK/JNK (#9252), anti-phosphoT180/Y182 p38 MAPK (D3F9, #4511), anti-p38 MAPK (D13E1, #8690), anti-phosphoS536 NF-kappaB p65 (93H1, #3033), anti-phosphoS32 I $\kappa$ B $\alpha$  (14D4, #2859), anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (#9242), anti-phosphoT71 ATF-2 (11G2, #5112), anti-ATF-2 (20F1, #9226), anti-phosphoS73 c-Jun (D47G9, #3270), anti-c-Jun (60A8, #9165), anti-cleaved Caspase 9 (D315, #9505) and anti-cleaved Caspase 3 (D175, #9664) were from Cell Signaling. Anti-actin clone AC-15 (#A5441) and anti-Flag M2 (#F1804) were purchased from Sigma-Aldrich, anti-IRF3 (#39033) was from Active Motif and anti-RSV (#AB1128) was from Chemicon International. Anti-phosphoS396 IRF3 was described in <sup>38</sup> and anti-SeV was obtained from Dr. J. Hiscott, McGill University, Montreal, Canada. HRP-conjugated goat anti-rabbit and rabbit anti-goat (Jackson Laboratories), and goat anti-mouse (Kirkegaard & Perry Laboratories) were used as secondary antibodies. Immunoblots were quantified using the ImageQuantTL software (Molecular Dynamics).

#### **4.3.5.4 Plasmids**

The human DUSP1-pCMV6XL5 plasmid was obtained from Origene. The pcdna3 Flag JIP1b (Addgene plasmid # 52123) and pcdna3 Flag JIP3b (Addgene plasmid # 53458) plasmids were a gift from Roger Davis<sup>50,94</sup>. All constructs were verified using Sanger sequencing at the McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Canada.

#### **4.3.5.5 Plasmid transfection**

Plasmid transfection in A549 cells was achieved using the TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus). Briefly, a total of 3 µg of DNA was transfected per 35 mm plates of A549 cells at 70 % confluency using a transfection reagent/DNA ratio of 1:2. Transfection was pursued for 24 h to 48 h before further treatment, as indicated.

#### **4.3.5.6 qRT-PCR**

Total RNA were extracted using the RNAqueous-96 Isolation Kit (Ambion) and quantified. Reverse transcription was performed using 1 mg total RNA using the Quantitect reverse Transcription kit (Qiagen). Specific mRNA levels were quantified by qPCR using Fast start SYBR Green Kit (Roche) for *SeV N* (S: agtatgggaggaccacagaatgg, AS: ccttccaacacaatccagacc). A reaction without RT and a reaction with H<sub>2</sub>O were performed with each run to ensure absence of genomic DNA contamination. Fluorescence was collected using the Rotor-Gene 3000 Real Time Thermal Cycler (Corbett Research). Results were analyzed by the  $\Delta\Delta$ CT method after normalization to S9 mRNA levels (S: cgtctcgaccaagagctga, AS: ggtccttctcatcaagecgtc).

#### **4.3.5.7 Virus titration by plaque forming unit (pfu) assay**

RSV infectious virions were quantified by methylcellulose plaque forming units assay. Briefly, supernatant from infected plates was harvested and subjected to serial dilutions before

being used to infect monolayers of Vero cells. After 2 h of infection, Vero cells were washed and covered with 1 % methylcellulose prepared in DMEM containing 2 % FBS. RSV plaques were immunodetected at 5 days post-infection. After removal of the methylcellulose, cells were fixed in 80 % methanol for 30 min and air-dried. Plates were incubated for 15 min at room temperature (RT) in PBS 0.1X pH 7.2 containing 2 % milk and 0.05 % tween before being incubated with anti-RSV antibodies (#AB1128, Chemicon International) for 3 h at RT, washed 3 times in PBS 0.1 X pH 7.2 containing 0.05 % tween and finally incubated with rabbit anti-goat antibodies (Jackson Laboratories) for 1 h at RT. After 3 more washes, plates were incubated with Enhanced Chemiluminescence substrate (ECL, Perkin Elmer Life Sciences) for 5 min at RT and chemiluminescence signal was detected using a CCD camera-based apparatus (LAS4000 mini, GE healthcare). Quantification of plaques was performed using the ImageQuantTL software (Molecular Dynamics) and expressed as pfu/ml.

#### **4.3.5.8 RNAi transfection**

RNAi oligonucleotide (ON-target siRNA, Dharmacon) transfection was performed using the Oligofectamine reagent (Invitrogen). A non-targeting sequence, described in <sup>13</sup>, was used as control. For efficient DUSP1 expression silencing, a mix of two siRNA sequences, caguuuggugaugacuuauu and ccgacgacacauuacauuu, were used. Cells were plated at 30 % confluency and transfected for 24-48 h before further treatment depending on specific experimental design.

#### **4.3.5.9 Co-immunoprecipitation experiments**

WCE were prepared as described in the immunoblot section. For co-immunoprecipitation studies, 1-1.5 mg of WCE were incubated with 2 µg anti-Flag M2 antibodies (#F1804, Sigma-Aldrich) linked to 30 µl protein G Sepharose beads (Sigma-Aldrich) for 3 h at 4 °C. Beads were washed 5 times with lysis buffer and the elution of immunocomplexes was performed by incubation with a solution of 100 µg/ml Flag peptide (#F3290, Sigma-Aldrich) prepared in lysis buffer for 2 h at 4 °C. Immunoprecipitates were

then denatured with 1:4 (v/v) 5X loading buffer<sup>93</sup> and heated for 5 min at 100 °C. WCE and immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE as described in the immunoblot section.

#### **4.3.5.10 Luminex-based quantification of cytokines**

Supernatants from infected A549 cells were collected and centrifuged for 5 min at 1000 g followed by a 10 min centrifugation at 10 000 g to remove cell debris. RSV-infected supernatants were UV-inactivated for 20 min before further analysis. Cytokines were quantified by Luminex xMAP Technology using the Bio-Plex Pro<sup>TM</sup> Human Cytokine Standard Plex Group I and Group II or custom assembled plex for IFN $\beta$ , IL-6, CXCL8, CCL2 or CCL5 from Bio-Rad on a Bio-Plex 200 System (Bio-Rad). Analyses were performed using the Bio-Plex Manager Software version 6.0.0.617. Heatmaps were produced from the raw expression analysis data using *R*<sup>95</sup> and the *gplots* package<sup>96</sup> on logarithmically transformed, centered and scaled data.

#### **4.3.5.11 Detection of apoptosis by flow cytometry (Annexin V/PI staining)**

For detection of apoptosis, the supernatant of cell culture was collected and cells were harvested using 0.05 % trypsin-EDTA. Supernatant and cells were pooled and centrifuged for 5 min at 250 g at 4 °C. The cell pellet was resuspended in Annexin V buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>) and stained using 1  $\mu$ l of FITC-Annexin V (#556419, BD Biosciences) and 1  $\mu$ l of Propidium Iodide (PI, 1 mg/ml, #P-4170, Sigma-Aldrich) per 2-5 x 10<sup>5</sup> cells for 10 min at 4 °C. Immediately after staining, acquisition of fluorescence was performed on a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences) using the BD FACSDiva Software (BD Biosciences). A minimum of 10 000 cells was analyzed for each sample. Data were analyzed using the FlowJo software (FlowJo, LLC).

#### **4.3.5.12 Analysis of cell migration**

Two-dimensional cell migration of single cells (9 cells/picture and 4 pictures/condition) was evaluated by single-cell tracking using live-video microscopy. Images were captured at 5 min intervals over an 18 h period by digital camera connected to a Zeiss microscope (Axio Observer.Z1) as in <sup>97</sup>. The cell trajectories were analysed using the Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

#### **4.3.5.13 Statistical analyses**

Quantitative results are represented as mean +/- SEM. Statistical comparisons were performed with Prism 7 software (GraphPad) using the indicated tests. The following *P*-values were considered significant:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) or  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).

#### **4.3.6 Acknowledgements**

We thank members of the laboratory and of the immunovirology group at CRCHUM for fruitful discussions. We also thank François-Christophe Marois-Blanchet and François Harvey at the CRCHUM bioinformatics facility and Dr. Dominique Gauchat and Annie Gosselin at the CRCHUM flow cytometry platform.

The present work was funded by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) [MOP-130527] and by the Research Chair in signaling in virus infection and oncogenesis from the Université de Montréal to NG. ACR was supported by graduate studentships from CIHR, the Fonds de la Recherche du Québec en Santé (FRQS) and the Réseau en Santé Respiratoire du FRQS. AG was recipient of a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). NZ was recipient of a post-doctoral fellowship from FRQS/INSERM (Québec/France) and DA by a post-doctoral fellowship from FRQS. NG was recipient of a Tier II Canada Research Chair.

### 4.3.7 Competing Financial Interests

The authors declare no competing financial interests.

### 4.3.8 References

- 1 Afonso, C. L. *et al.* Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol* **161**, 2351-2360, DOI:10.1007/s00705-016-2880-1 (2016).
- 2 Rima, B. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J Gen Virol*, DOI:10.1099/jgv.0.000959 (2017).
- 3 Russell, C. J. & Hurwitz, J. L. Sendai virus as a backbone for vaccines against RSV and other human paramyxoviruses. *Expert review of vaccines* **15**, 189-200, DOI:10.1586/14760584.2016.1114418 (2016).
- 4 Simoes, E. A. *et al.* Challenges and opportunities in developing respiratory syncytial virus therapeutics. *J Infect Dis* **211 Suppl 1**, S1-s20, DOI:10.1093/infdis/jiu828 (2015).
- 5 Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D. H., Beutler, B. & Theofilopoulos, A. N. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* **13**, 543-551, DOI:10.1038/nm1590 (2007).
- 6 Kato, H. & Fujita, T. RIG-I-like receptors and autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* **37**, 40-45, DOI:10.1016/j.coi.2015.10.002 (2015).
- 7 Allie, S. R. & Randall, T. D. Pulmonary immunity to viruses. *Clinical science (London, England : 1979)* **131**, 1737-1762, DOI:10.1042/CS20160259 (2017).
- 8 Orzalli, M. H. & Kagan, J. C. Apoptosis and Necroptosis as Host Defense Strategies to Prevent Viral Infection. *Trends in cell biology*, DOI:10.1016/j.tcb.2017.05.007 (2017).
- 9 Quicke, K. M., Diamond, M. S. & Suthar, M. S. Negative regulators of the RIG-I-like receptor signaling pathway. *Eur J Immunol* **47**, 615-628, DOI:10.1002/eji.201646484 (2017).
- 10 Servant, M. J., Grandvaux, N. & Hiscott, J. Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3. *Biochem Pharmacol* **64**, 985-992 (2002).
- 11 Taylor, K. E. & Mossman, K. L. Recent advances in understanding viral evasion of type I interferon. *Immunology* **138**, 190-197, DOI:10.1111/imm.12038 (2013).
- 12 Yoneyama, M., Onomoto, K., Jogi, M., Akaboshi, T. & Fujita, T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol* **32**, 48-53, DOI:10.1016/j.coi.2014.12.012 (2015).

- 13 Sharma, S. *et al.* Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148-1151, DOI: 10.1126/science.1081315 (2003).
- 14 Fitzgerald, K. A. *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 491-496. (2003).
- 15 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**, 3984-3996, DOI:10.1128/JVI.02526-07 (2008).
- 16 Mori, M. *et al.* Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* **279**, 9698-9702, DOI:10.1074/jbc.M310616200 (2004).
- 17 Fujii, K., Nakamura, S., Takahashi, K. & Inagaki, F. Systematic characterization by mass spectrometric analysis of phosphorylation sites in IRF-3 regulatory domain activated by IKK-i. *Journal of proteomics* **73**, 1196-1203, DOI:10.1016/j.jprot.2010.02.009 (2010).
- 18 Fink, K., Duval, A., Martel, A., Soucy-Faulkner, A. & Grandvaux, N. 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, DOI: 10.4049/jimmunol.180.10.6911 (2008).
- 19 Liu, P. *et al.* Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *J Virol* **81**, 1401-1411, DOI: 10.1128/JVI.01740-06 (2007).
- 20 Ford, E. & Thanos, D. The transcriptional code of human IFN-beta gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 328-336, DOI:10.1016/j.bbagr.2010.01.010 (2010).
- 21 Zhang, S. *et al.* The c-Jun N-terminal kinase (JNK) is involved in H5N1 influenza A virus RNA and protein synthesis. *Arch Virol* **161**, 345-351, DOI:10.1007/s00705-015-2668-8 (2016).
- 22 Gurtler, C. & Bowie, A. G. Innate immune detection of microbial nucleic acids. *Trends in microbiology* **21**, 413-420, DOI:10.1016/j.tim.2013.04.004 (2013).
- 23 Dixit, E. & Kagan, J. C. Intracellular Pathogen Detection by RIG-I-Like Receptors. *Adv Immunol* **117**, 99-125, DOI:10.1016/B978-0-12-410524-9.00004-9 (2013).
- 24 Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology* **32**, 513-545, DOI:10.1146/annurev-immunol-032713-120231 (2014).
- 25 Li, M. M., MacDonald, M. R. & Rice, C. M. To translate, or not to translate: viral and host mRNA regulation by interferon-stimulated genes. *Trends in cell biology* **25**, 320-329, DOI:10.1016/j.tcb.2015.02.001 (2015).
- 26 Liu, S. Y., Sanchez, D. J. & Cheng, G. New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon. *Curr Opin Immunol* **23**, 57-64, DOI:10.1016/j.coi.2010.11.003 (2011).

- 27 Chiang, C. & Gack, M. U. Post-translational Control of Intracellular Pathogen Sensing Pathways. *Trends in immunology* **38**, 39-52, DOI:10.1016/j.it.2016.10.008 (2017).
- 28 Wies, E. *et al.* Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* **38**, 437-449, DOI:10.1016/j.immuni.2012.11.018 (2013).
- 29 Gu, M. *et al.* Protein phosphatase PP1 negatively regulates the Toll-like receptor- and RIG-I-like receptor-triggered production of type I interferon by inhibiting IRF3 phosphorylation at serines 396 and 385 in macrophage. *Cell Signal* **26**, 2930-2939, DOI:10.1016/j.cellsig.2014.09.007 (2014).
- 30 Long, L. *et al.* Recruitment of phosphatase PP2A by RACK1 adaptor protein deactivates transcription factor IRF3 and limits type I interferon signaling. *Immunity* **40**, 515-529, DOI:10.1016/j.immuni.2014.01.015 (2014).
- 31 James, Sharmy J. *et al.* MAPK Phosphatase 5 Expression Induced by Influenza and Other RNA Virus Infection Negatively Regulates IRF3 Activation and Type I Interferon Response. *Cell Reports* **10**, 1722-1734, DOI:10.1016/j.celrep.2015.02.030 (2015).
- 32 Peng, D., Wang, Z., Huang, A., Zhao, Y. & Qin, F. X. A Novel Function of F-Box Protein FBXO17 in Negative Regulation of Type I IFN Signaling by Recruiting PP2A for IFN Regulatory Factor 3 Deactivation. *J Immunol* **198**, 808-819, DOI:10.4049/jimmunol.1601009 (2017).
- 33 Zhao, Y. *et al.* PPM1B negatively regulates antiviral response via dephosphorylating TBK1. *Cell Signal* **24**, 2197-2204, DOI:10.1016/j.cellsig.2012.06.017 (2012).
- 34 Xiang, W., Zhang, Q. & Lin, X. PPM1A silences cytosolic RNA sensing and antiviral defense through direct dephosphorylation of MAVS and TBK1. *Sci Adv* **2**, e1501889, DOI:10.1126/sciadv.1501889 (2016).
- 35 Lin, Y. W., Chuang, S. M. & Yang, J. L. ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **278**, 21534-21541, DOI:10.1074/jbc.M301854200 (2003).
- 36 Eisenacher, K. & Krug, A. Regulation of RLR-mediated innate immune signaling--it is all about keeping the balance. *Eur J Cell Biol* **91**, 36-47, DOI:10.1016/j.ejcb.2011.01.011 (2012).
- 37 Yoboua, F., Martel, A., Duval, A., Mukawera, E. & Grandvaux, N. 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, DOI:10.1128/JVI.00142-10 (2010).
- 38 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**, 9441-9447, DOI:10.1074/jbc.M209851200 (2003).



- 39 Franklin, C. C. & Kraft, A. S. Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem* **272**, 16917-16923 (1997).
- 40 Zhao, Q. *et al.* The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J Biol Chem* **280**, 8101-8108, DOI:10.1074/jbc.M411760200 (2005).
- 41 Dhanasekaran, D. N., Kashef, K., Lee, C. M., Xu, H. & Reddy, E. P. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**, 3185-3202, DOI: 10.1038/sj.onc.1210411 (2007).
- 42 Zeke, A., Misheva, M., Remenyi, A. & Bogoyevitch, M. A. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**, 793-835, DOI:10.1128/mmbr.00043-14 (2016).
- 43 Dickens, M. *et al.* A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* **277**, 693-696 (1997).
- 44 Di, A. *et al.* A novel function of sphingosine kinase 1 suppression of JNK activity in preventing inflammation and injury. *J Biol Chem* **285**, 15848-15857, DOI:10.1074/jbc.M109.075549 (2010).
- 45 Kelkar, N. *et al.* Morphogenesis of the telencephalic commissure requires scaffold protein JNK-interacting protein 3 (JIP3). *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9843-9848, DOI:10.1073/pnas.1733944100 (2003).
- 46 Desai, L. P., White, S. R. & Waters, C. M. Mechanical stretch decreases FAK phosphorylation and reduces cell migration through loss of JIP3-induced JNK phosphorylation in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L520-529, DOI:10.1152/ajplung.00076.2009 (2009).
- 47 Yasuda, J., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sharma, M. & Davis, R. J. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 7245-7254 (1999).
- 48 Shankar, S., Mohapatra, B. & Suri, A. Cloning of a novel human testis mRNA specifically expressed in testicular haploid germ cells, having unique palindromic sequences and encoding a leucine zipper dimerization motif. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 561-565, DOI:10.1006/bbrc.1997.7943 (1998).
- 49 Yasuoka, H. *et al.* A Novel Protein Highly Expressed in Testis Is Overexpressed in Systemic Sclerosis Fibroblasts and Targeted by Autoantibodies. *The Journal of Immunology* **171**, 6883-6890, DOI:10.4049/jimmunol.171.12.6883 (2003).
- 50 Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J. & Davis, R. J. A Mammalian Scaffold Complex That Selectively Mediates MAP Kinase Activation. *Science* **281**, 1671-1674, DOI:10.1126/science.281.5383.1671 (1998).

- 51 Whitmarsh, A. J. *et al.* Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* **15**, 2421-2432, DOI:10.1101/gad.922801 (2001).
- 52 Melino, M., Hii, C. S., McColl, S. R. & Ferrante, A. The effect of the JNK inhibitor, JIP peptide, on human T lymphocyte proliferation and cytokine production. *J Immunol* **181**, 7300-7306 (2008).
- 53 Blanco, S., Sanz-Garcia, M., Santos, C. R. & Lazo, P. A. Modulation of interleukin-1 transcriptional response by the interaction between VRK2 and the JIP1 scaffold protein. *PLoS One* **3**, e1660, DOI:10.1371/journal.pone.0001660 (2008).
- 54 Ventura, J. J. *et al.* Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* **21**, 701-710, DOI:10.1016/j.molcel.2006.01.018 (2006).
- 55 Arbour, N. *et al.* c-Jun NH(2)-Terminal Kinase (JNK)1 and JNK2 Signaling Pathways Have Divergent Roles in CD8(+) T Cell-mediated Antiviral Immunity. *The Journal of Experimental Medicine* **195**, 801-810, DOI:10.1084/jem.20011481 (2002).
- 56 Zhang, H. *et al.* Activation of PI3K/Akt pathway limits JNK-mediated apoptosis during EV71 infection. *Virus Research* **192**, 74-84, DOI: 10.1016/j.virusres.2014.07.026 (2014).
- 57 Gillis, P. A., Okagaki, L. H. & Rice, S. A. Herpes Simplex Virus Type 1 ICP27 Induces p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Apoptosis in HeLa Cells. *Journal of Virology* **83**, 1767-1777, DOI:10.1128/jvi.01944-08 (2009).
- 58 Liu, J. & Lin, A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Res* **15**, 36-4, DOI: 10.1038/sj.cr.72902622 (2005).
- 59 Shiizaki, S., Naguro, I. & Ichijo, H. Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Advances in Biological Regulation* **53**, 135-144, DOI: 10.1016/j.jbior.2012.09.006 (2013).
- 60 Huang, Y. *et al.* MAVS-MKK7-JNK2 Defines a Novel Apoptotic Signaling Pathway during Viral Infection. *PLoS Pathog* **10**, e1004020, DOI:10.1371/journal.ppat.1004020 (2014).
- 61 Mosallanejad, K. *et al.* The DEAH-box RNA helicase DHX15 activates NF-kappaB and MAPK signaling downstream of MAVS during antiviral responses. *Sci Signal* **7**, ra40, DOI:10.1126/scisignal.2004841 (2014).
- 62 Wei, B. *et al.* Tom70 mediates Sendai virus-induced apoptosis on mitochondria. *J Virol* **89**, 3804-3818, DOI:10.1128/JVI.02959-14 (2015).
- 63 Kotelkin, A., Prikhod'ko, E. A., Cohen, J. I., Collins, P. L. & Bukreyev, A. Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Virol* **77**, 9156-9172 (2003).
- 64 Huang, C., Jacobson, K. & Schaller, M. D. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**, 4619-4628, DOI:10.1242/jcs.01481 (2004).
- 65 Korhonen, R. & Moilanen, E. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 as an inflammatory factor and drug target. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **114**, 24-36, DOI:10.1111/bcpt.12141 (2014).

- 66 Wang, X. & Liu, Y. Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. *Cellular Signalling* **19**, 1372-1382, DOI: 10.1016/j.cellsig.2007.03.013 (2007).
- 67 Clark, A. R. MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids? *The Journal of endocrinology* **178**, 5-12 (2003).
- 68 Smallie, T. *et al.* Dual-Specificity Phosphatase 1 and Tristetraprolin Cooperate To Regulate Macrophage Responses to Lipopolysaccharide. *J Immunol* **195**, 277-288, DOI:10.4049/jimmunol.1402830 (2015).
- 69 Chi, H. *et al.* Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2274-2279, DOI:10.1073/pnas.0510965103 (2006).
- 70 Xiao, j. *et al.* MiR-429 Regulates Alveolar Macrophage Inflammatory Cytokine Production and is Involved in LPS-induced Acute Lung Injury. *Biochemical Journal*, DOI:10.1042/bj20131510 (2015).
- 71 Golebski, K. *et al.* EGR-1 and DUSP-1 are important negative regulators of pro-allergic responses in airway epithelium. *Mol Immunol* **65**, 43-50, DOI:10.1016/j.molimm.2014.12.011 (2015).
- 72 Salojin, K. V. *et al.* Essential Role of MAPK Phosphatase-1 in the Negative Control of Innate Immune Responses. *The Journal of Immunology* **176**, 1899-1907, DOI:10.4049/jimmunol.176.3.1899 (2006).
- 73 Abraham, S. M. *et al.* Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *J Exp Med* **203**, 1883-1889, DOI:10.1084/jem.20060336 (2006).
- 74 Moon, J. & Park, S. H. Reassembly of JIP1 scaffold complex in JNK MAP kinase pathway using heterologous protein interactions. *PLoS One* **9**, e96797, DOI:10.1371/journal.pone.0096797 (2014).
- 75 Caunt, C. J. & Keyse, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS j* **280**, 489-504, DOI:10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x (2013).
- 76 Kondoh, K. & Nishida, E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**, 1227-1237, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.12.002 (2007).
- 77 Zehorai, E. & Seger, R. Beta-like importins mediate the nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* **34**, 259-270, DOI:10.1128/mcb.00799-13 (2014).
- 78 Liao, Y., Wang, X., Huang, M., Tam, J. P. & Liu, D. X. Regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase and dual-specificity phosphatase 1 feedback loop modulates the induction of interleukin 6 and 8 in cells infected with coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* **420**, 106-116, DOI:10.1016/j.virol.2011.09.003 (2011).

- 79 Cáceres, A. *et al.* Involvement of the Cellular Phosphatase DUSP1 in Vaccinia Virus Infection. *PLoS Pathogens* **9**, e1003719, DOI:10.1371/journal.ppat.1003719 (2013).
- 80 Santos, C. R., Blanco, S., Sevilla, A. & Lazo, P. A. Vaccinia virus B1R kinase interacts with JIP1 and modulates c-Jun-dependent signaling. *J Virol* **80**, 7667-7675, DOI:10.1128/jvi.00967-06 (2006).
- 81 Sun, Y. *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of receptor and signal transduction research* **35**, 600-604, DOI:10.3109/10799893.2015.1030412 (2015).
- 82 Zhang, Q. *et al.* IPS-1 plays a dual function to directly induce apoptosis in murine melanoma cells by inactivated Sendai virus. *Int J Cancer* **134**, 224-234, DOI:10.1002/ijc.28340 (2014).
- 83 Gao, H. *et al.* Induction of apoptosis in hormone-resistant human prostate cancer PC3 cells by inactivated Sendai virus. *Biomedical and environmental sciences : BES* **27**, 506-514, DOI:10.3967/bes2014.082 (2014).
- 84 Kim, A. H. *et al.* Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* **35**, 697-709 (2002).
- 85 Barber, G. N. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell death and differentiation* **8**, 113-126, DOI: 10.1038/sj.cdd.4400823 (2001).
- 86 Tisoncik, J. R. *et al.* Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 16-32, DOI:10.1128/mubr.05015-11 (2012).
- 87 Stebbins, J. L. *et al.* Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16809-16813, DOI:10.1073/pnas.0805677105 (2008).
- 88 Bonny, C., Oberson, A., Negri, S., Sauser, C. & Schorderet, D. F. Cell-Permeable Peptide Inhibitors of JNK. *Novel Blockers of  $\beta$ -Cell Death* **50**, 77-82, DOI:10.2337/diabetes.50.1.77 (2001).
- 89 Barr, R. K., Kendrick, T. S. & Bogoyevitch, M. A. Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity. *J Biol Chem* **277**, 10987-10997, DOI:10.1074/jbc.M107565200 (2002).
- 90 Borsello, T. *et al.* A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* **9**, 1180-1186, DOI:10.1038/nm911 (2003).
- 91 Vogt, A. *et al.* The benzo[c]phenanthridine alkaloid, sanguinarine, is a selective, cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* **280**, 19078-19086, DOI:10.1074/jbc.M501467200 (2005).
- 92 Chen, P. *et al.* Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol* **169**, 6408-6416 (2002).

- 93 Robitaille, A. C., Mariani, M. K., Fortin, A. & Grandvaux, N. A High Resolution Method to Monitor Phosphorylation-dependent Activation of IRF3. *J Vis Exp*, e53723, DOI:10.3791/53723 (2016).
- 94 Kelkar, N., Gupta, S., Dickens, M. & Davis, R. J. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol* **20**, 1030-1043 (2000).
- 95 R: A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016).
- 96 Warnes, G. R. *et al.* gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data. R package version 3.0.1. (2016).
- 97 Girault, A. *et al.* Complementary roles of KCa3.1 channels and beta1-integrin during alveolar epithelial repair. *Respiratory research* **16**, 100, DOI:10.1186/s12931-015-0263-x (2015).

### 4.3.9 Titles and Legends to Figures

#### **Figure 1: DUSP1 is induced during SeV and RSV infections and subjected to proteasomal degradation.**

In **A and B**, A549 cells were infected with SeV at 40 HAU/10<sup>6</sup> cells or RSV at a MOI of 3 for the indicated times. In **B**, cells were pre-treated with MG132 (5 μM) or DMSO (vehicle) before infection for 6 h. WCE were analyzed by immunoblot using anti-DUSP1 specific antibodies. Detection of tubulin was used to control for equal loading. The data are representative of at least three independent experiments. Samples that are compared derive from the same experiment. Quantification of DUSP1 levels normalized over tubulin are represented as mean +/- SEM, n=7 (**A**) and n=3 (**B**). Statistical comparisons were performed using RM one-way ANOVA with Dunnett's (**A**) or Tukey's (**B**) post-tests. Full-length blots are presented in **Supplementary Figure 3**. NS: non-specific.

#### **Figure 2: DUSP1 expression does not alter the antiviral pathways triggered by SeV and RSV infections.**

A549 cells were transfected with an empty- or DUSP1-expressing plasmid (**A-D**) or with Ctrl or DUSP1 specific siRNA (**E**) before infection with SeV at 40 (**A and B**) or 5 HAU/10<sup>6</sup> cells (**D, top panel**) or with RSV at MOI of 3 (**C**) or 1 (**D, bottom panel and E**) for the indicated times. In **A-C**, immunoblot analyses were performed to detect DUSP1, phosphorylated p65 (p65-P), total p65, phosphorylated IκBα (IκBα-P), total IκBα, phosphorylated IRF3 (IRF3-P) and total IRF3. Infection was monitored using anti-SeV or anti-RSV antibodies (N proteins are shown). Detection of actin was used as a loading control. The data are representative of three different experiments. Samples that are compared derive from the same experiment. Full-length blots are presented in **Supplementary Figure 4**. In **D**, SeV N mRNA was quantified by qRT-PCR. In **D and E**, the release of infectious RSV virions was quantified by plaque forming unit (pfu) assay. Data are represented as mean +/- SEM, n=6 (**D, top panel**) or n=8 (**D, bottom panel and E**) and analyzed using two-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

**Figure 3: Ectopic expression of DUSP1 inhibits JNK and p38 phosphorylation elicited by SeV and RSV infections.**

A549 cells were transfected with an empty- or DUSP1-encoding plasmid before infection with SeV at 40 HAU/10<sup>6</sup> cells (**A and B**) or RSV at a MOI of 3 (**C**) for the indicated times. Levels of DUSP1, phosphorylated JNK (JNK-P), total JNK, phosphorylated p38 (p38-P), total p38, SeV N and RSV N protein levels were monitored by immunoblot. Equal loading was verified using anti-tubulin antibodies. The data are representative of at least three independent experiments. Samples that are compared derive from the same experiment and blots were processed in parallel. Full-length blots are presented in **Supplementary Figure 5**. NS: non-specific.

**Figure 4: DUSP1 silencing increases SeV- and RSV-induced JNK and p38 phosphorylation.**

A549 cells were transfected with Ctrl or DUSP1-specific siRNA before being left uninfected or infected with SeV at 40 HAU/10<sup>6</sup> cells (**A**) or RSV at MOI of 3 (**B**) for various times. Immunoblot analyses were performed to verify the efficiency of DUSP1 silencing and expression levels of phosphorylated JNK (JNK-P), total JNK, phosphorylated p38 (p38-P) and total p38. Infection was monitored using anti-SeV and anti-RSV antibodies (N proteins are shown). Detection of actin was used as a loading control. The data are representative of at least three independent experiments. Samples that are compared derive from the same experiment and blots were processed in parallel. Full-length blots are presented in **Supplementary Figure 6**. NS: non-specific.

**Figure 5: JIP1 scaffold interacts with JNK and protects from dephosphorylation by DUSP1.**

A549 cells were transfected with the indicated combination of Flag-JIP1-, Flag-JIP3- and DUSP1-expressing plasmids or the corresponding empty plasmids, and left uninfected or

infected with SeV at 40 HAU/10<sup>6</sup> cells or RSV at MOI of 3 for 6 h. **In A**, WCE were subjected to immunoprecipitation (IP) using anti-Flag antibodies followed by immunoblot. In **B and C**, WCE were resolved by SDS-PAGE before immunoblot. In **A, B and C**, levels of protein expression were assessed using anti-Flag, anti-phosphorylated JNK (JNK-P), anti-JNK and anti-DUSP1 antibodies. Tubulin was used as a loading control. Data are representative of at least three different experiments. Samples that are compared derive from the same experiment. **In D**, quantification of phosphorylated JNK levels normalized over total JNK in DUSP1 expressing cells in the absence or presence of JIP1 are shown. Mean +/- SEM, n≥3. Statistical comparisons were performed using RM one-way ANOVA with Tukey's post-test. Full-length blots are presented in **Supplementary Figure 7**. NS: non-specific.

**Figure 6: DUSP1-mediated inhibition of JNK and p38 leaves virus-mediated activation of AP-1 and cytokine production intact.**

A549 cells were either pretreated with DMSO (vehicle) or SB203580 (10 μM) + SP600125 (10 μM) for 30 min prior to infection (**A and D**), transfected with empty or DUSP1-expressing plasmids (**B, C and E**) or transfected with Control (siCtrl) or DUSP1-specific siRNA (**F and G**) before infection with SeV at 40 HAU/10<sup>6</sup> cells (**A, B, D, E and F**) or RSV at MOI of 3 (**C and G**) for the indicated times or for 6 h (**A and D**), 16 h (**E**) or 12 h (**F and G**). In **A-C**, levels of phosphorylated ATF-2 (ATF-2-P), total ATF-2, phosphorylated c-Jun (c-Jun-P), total c-Jun and DUSP1 were analyzed by immunoblot. Actin was used to verify equal loading. The data are representative of three independent experiments. Samples that are compared derive from the same experiment and blots were processed in parallel. Full-length blots are presented in **Supplementary Figure 8**. In **D-G**, release of cytokines was quantified using Luminex-based multiplex assays. Heatmaps represent cytokine levels (pg/ml) logarithmically transformed, centered and scaled, measured in each biological replicates (n=3 in **D, F and G**, n=6 in **E**). Scatter plots of cytokines levels are shown in **Supplemental Figure 1**.



**Figure 7: DUSP1 and JNK/p38 act on independent SeV-induced pro-apoptotic pathways.**

A549 cells were transfected with control (siCtrl) or DUSP1-specific siRNA for 48 h and pretreated with DMSO (vehicle) or SB203580 + SP600125 (10  $\mu$ M each) for 30 min before infection with SeV at 40 HAU/10<sup>6</sup> cells for 8 h (A) or the indicated times (B). In A, cells were harvested and stained with Annexin V-FITC and PI and analyzed by flow cytometry. The left bar graph represents the percentage of Annexin V positive (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> and Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>; Q2 and Q3) apoptotic cells. Mean +/- SEM, n=8 independent replicates. Statistical comparisons amongst infected cells were performed by RM one-way ANOVA with Tukey's post-test. Representative FACS plots are shown. In B, DUSP1, cleaved Caspase 9 (c-Caspase 9) and cleaved Caspase 3 (c-Caspase 3) protein levels were monitored by immunoblot. Equal loading was verified using anti-tubulin antibodies. The data are representative of three independent experiments. Samples that are compared derive from the same experiment and blots were processed in parallel. Full-length blots are presented in **Supplementary Figure 9**. NS: non-specific.

**Figure 8: DUSP1 impairs cell migration during RSV infection.**

A549 cells were transfected with control (siCtrl) or DUSP1-specific siRNA before RSV infection at a MOI of 3 for 8 h. Single-cell tracking was performed using live-video microscopy to monitor two-dimensional cell migration. Trajectories of 9 cells per conditions are presented. The origins of cell trajectories have been aligned to start at the position (x = 0; y = 0). The data are representative of two independent experiments for non-infected conditions and four independent experiments for RSV-infected conditions. Original live video imaging of cell tracking are available in **Supplementary Movie 1**.

### 4.3.10 Figures

Figure 1

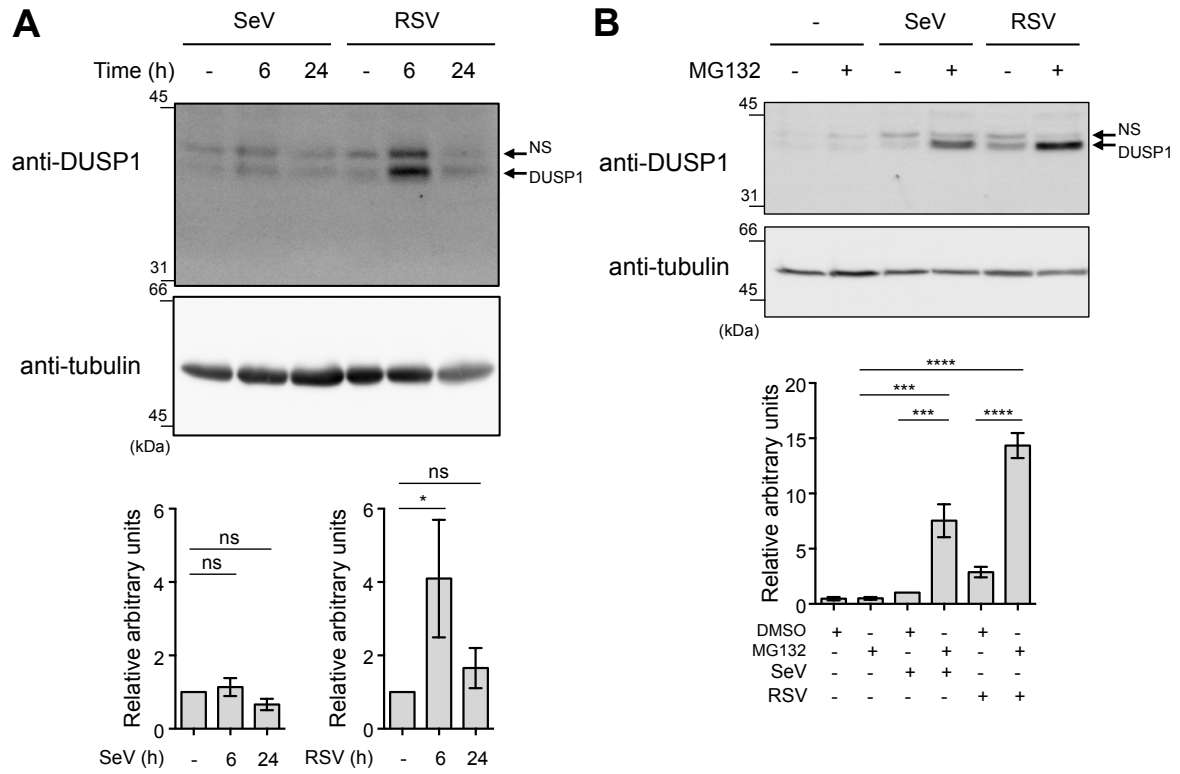


Figure 2

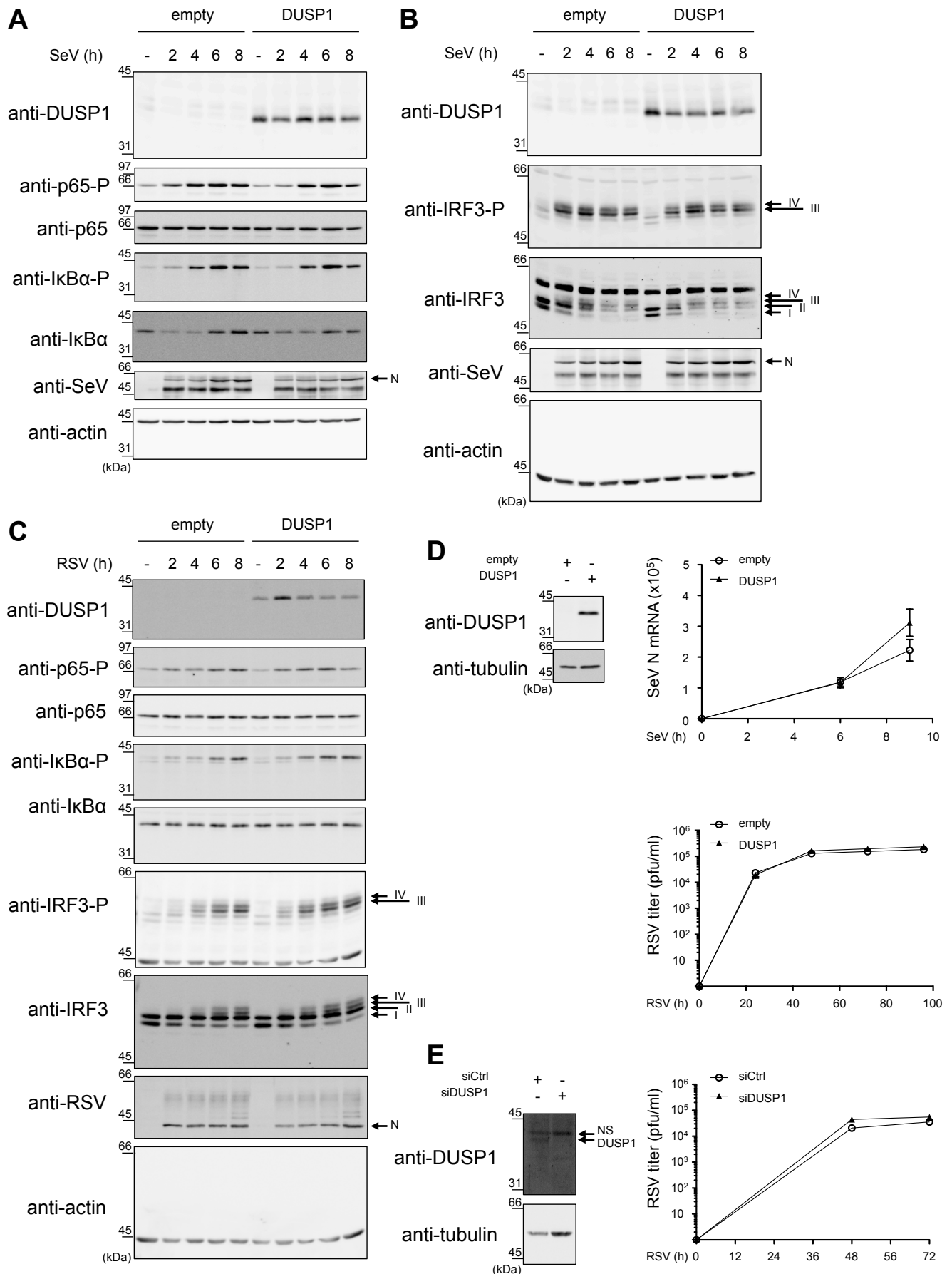


Figure 3

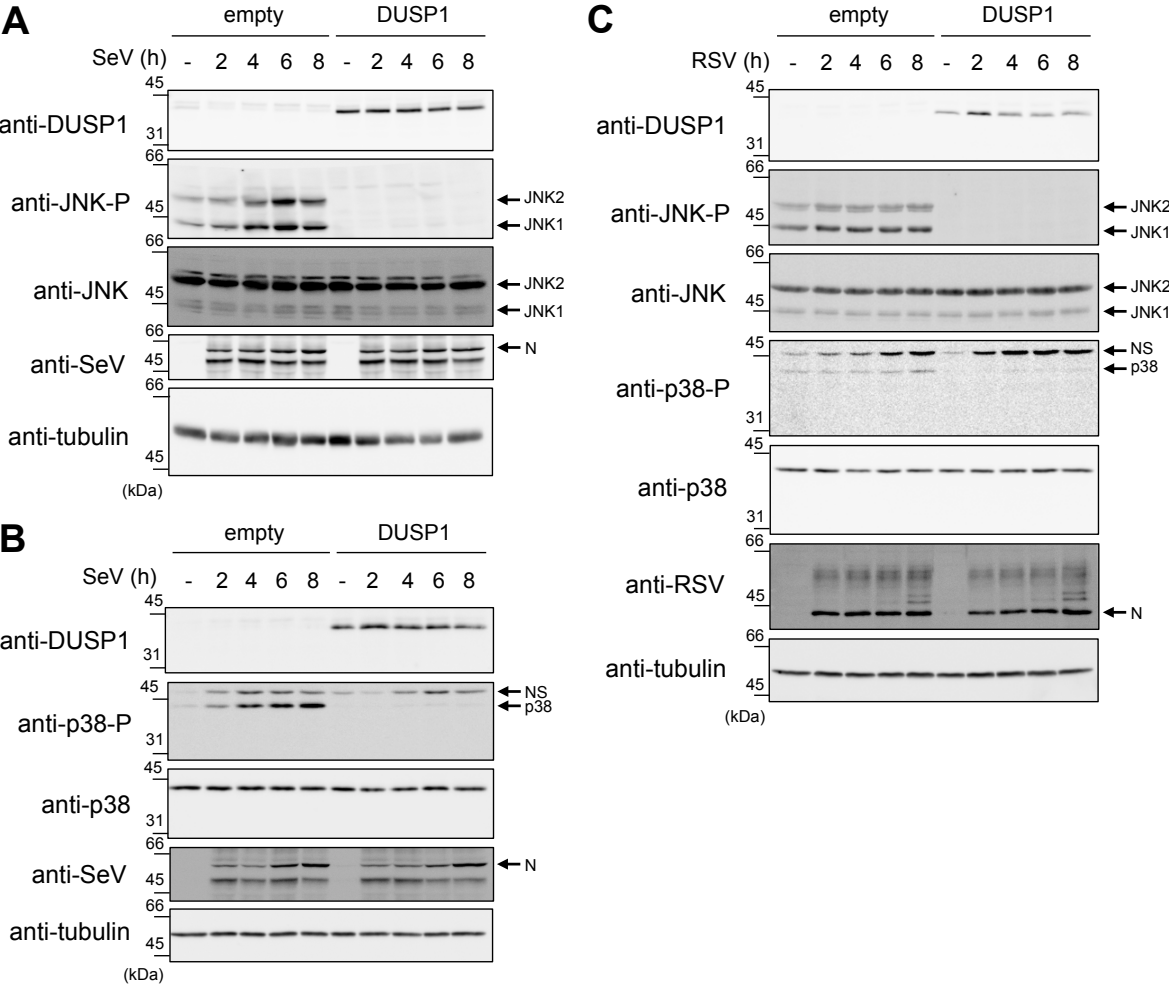


Figure 4

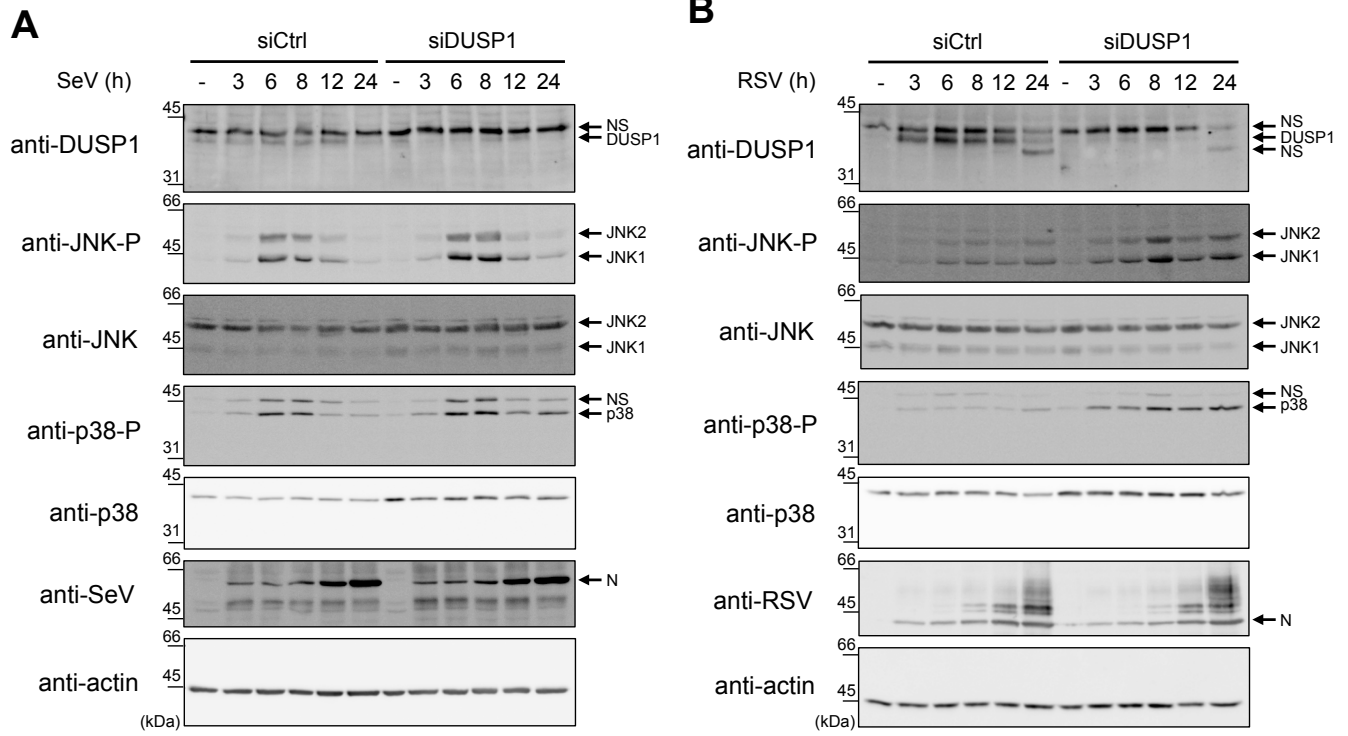


Figure 5

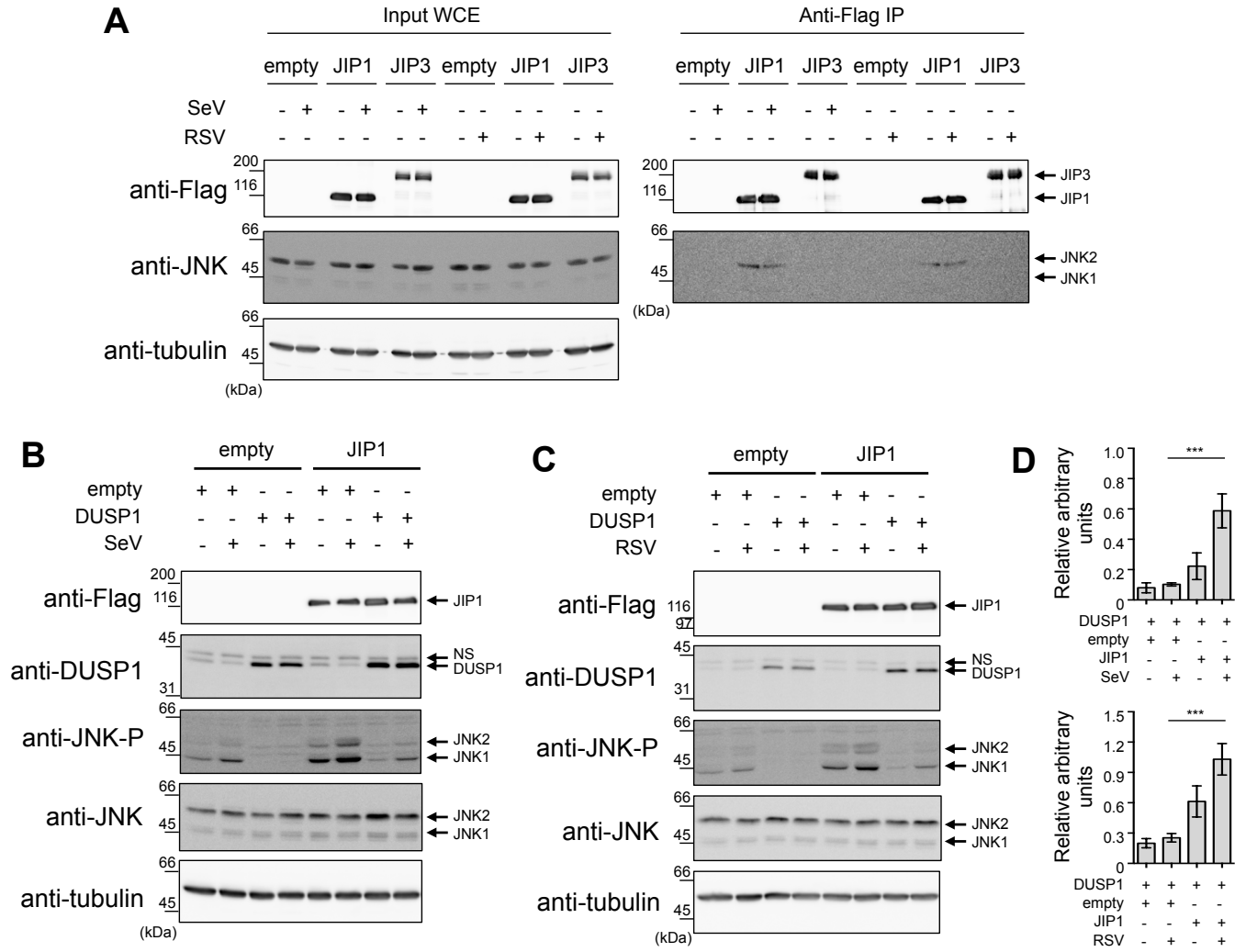


Figure 6

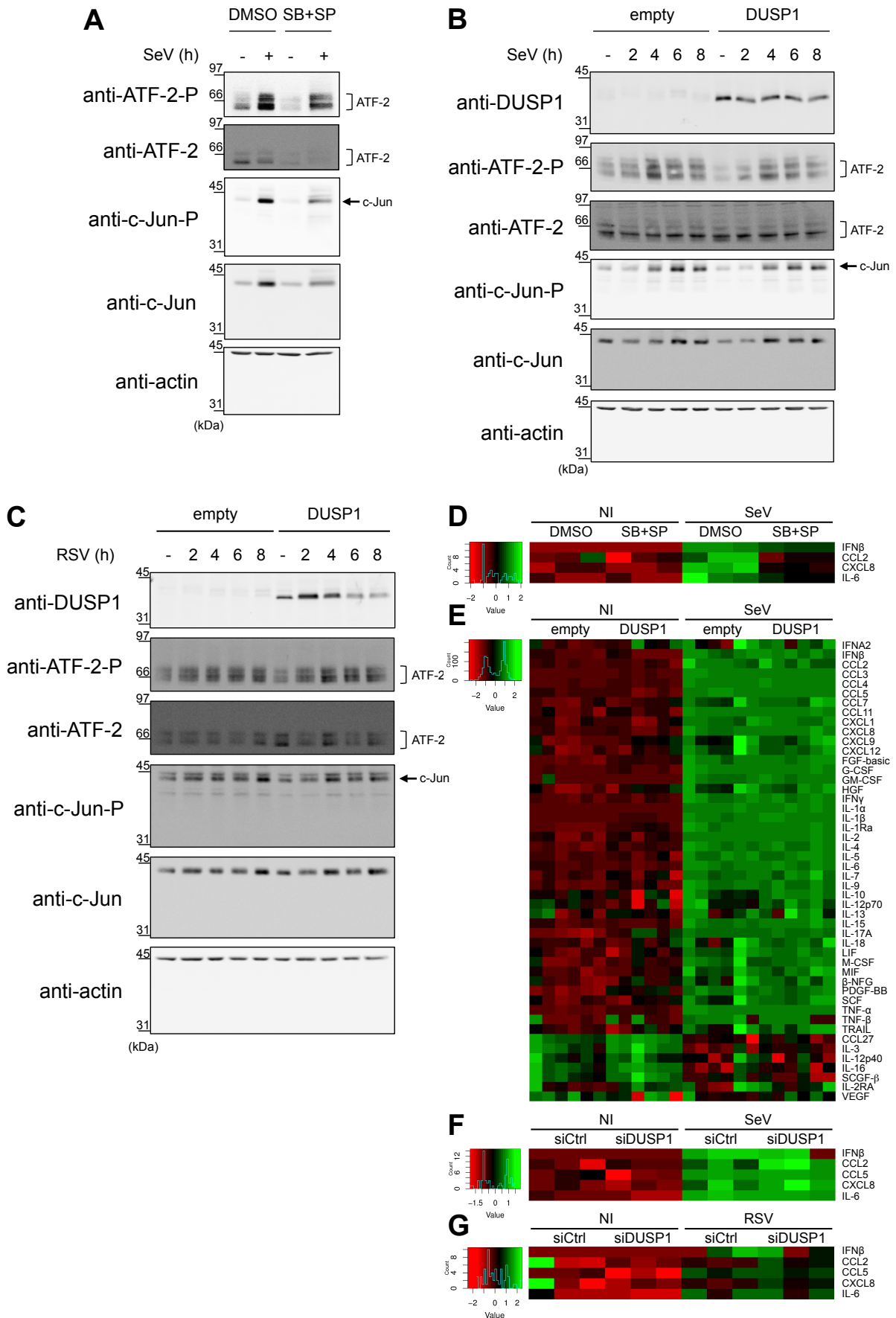
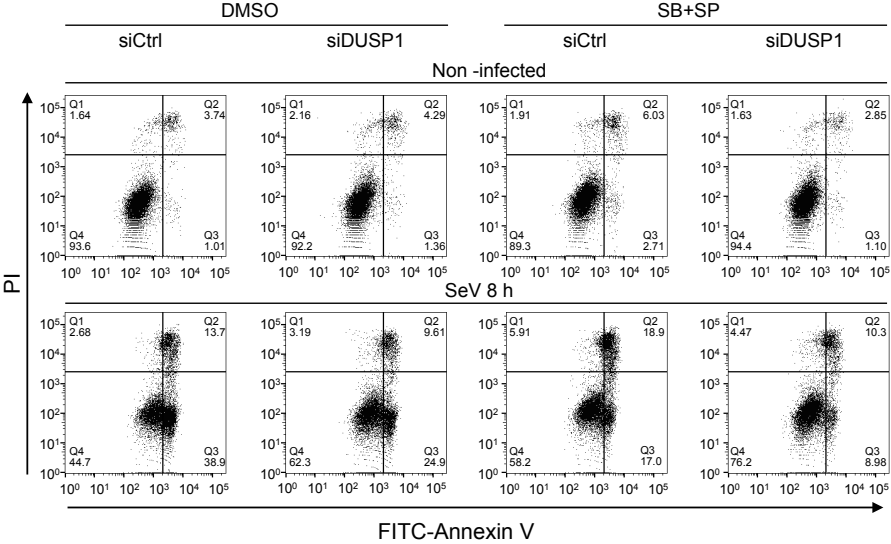
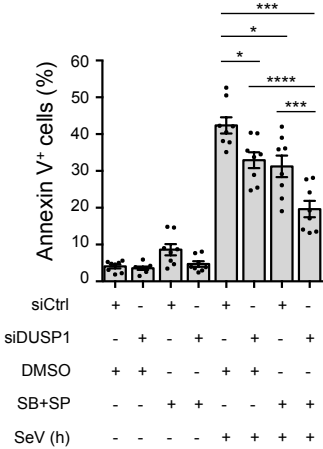




Figure 7

**A**



**B**

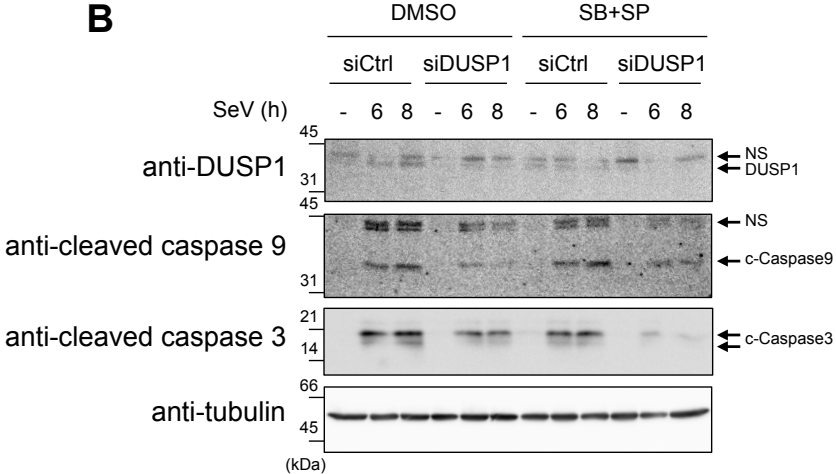
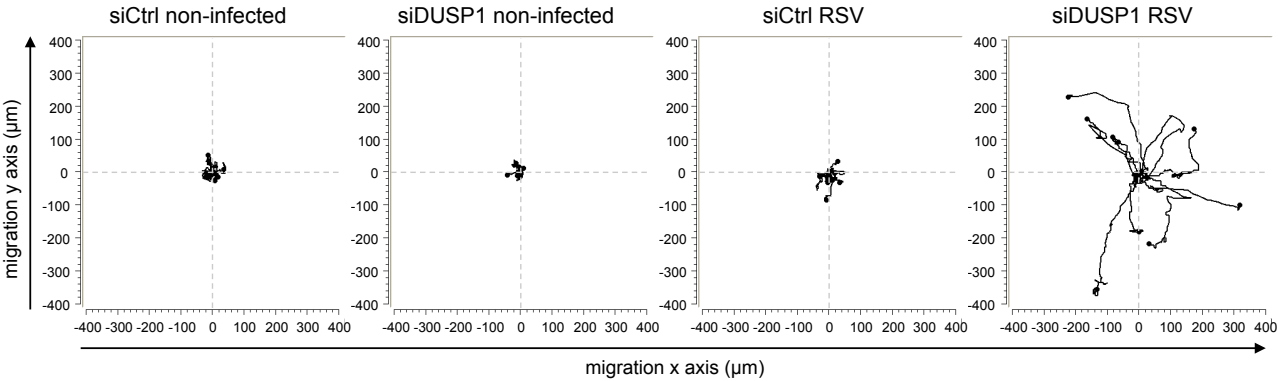
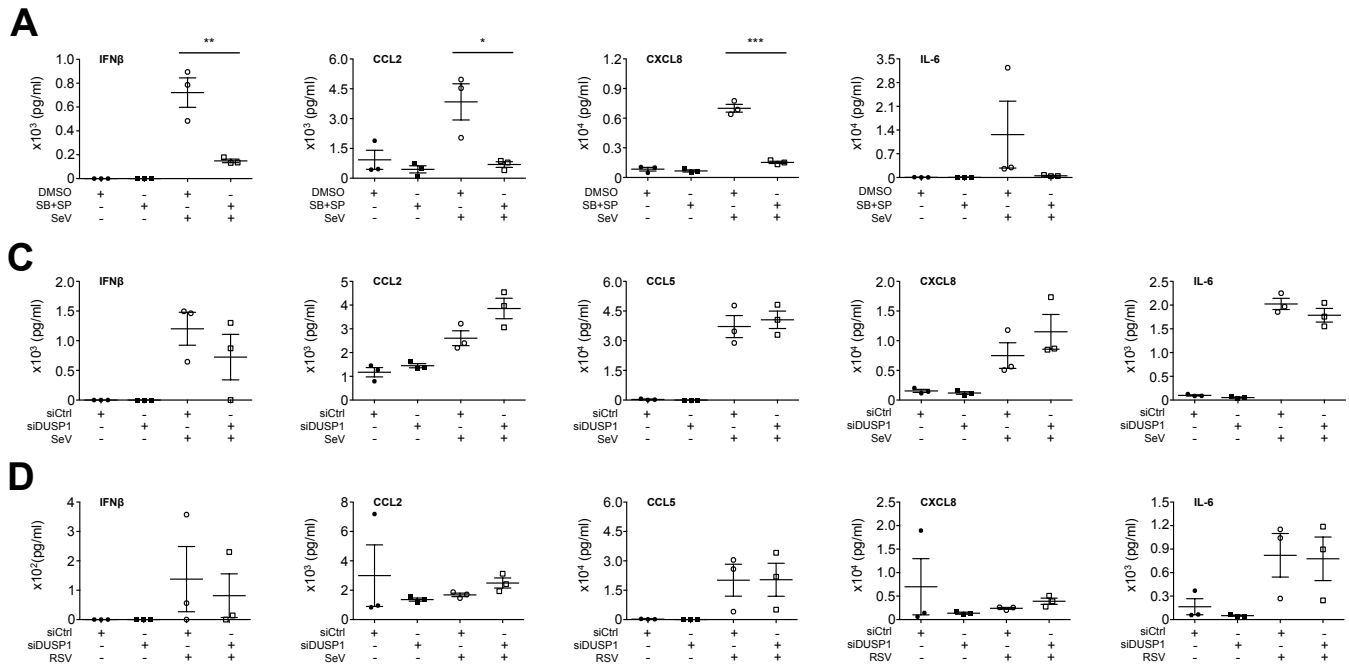


Figure 8



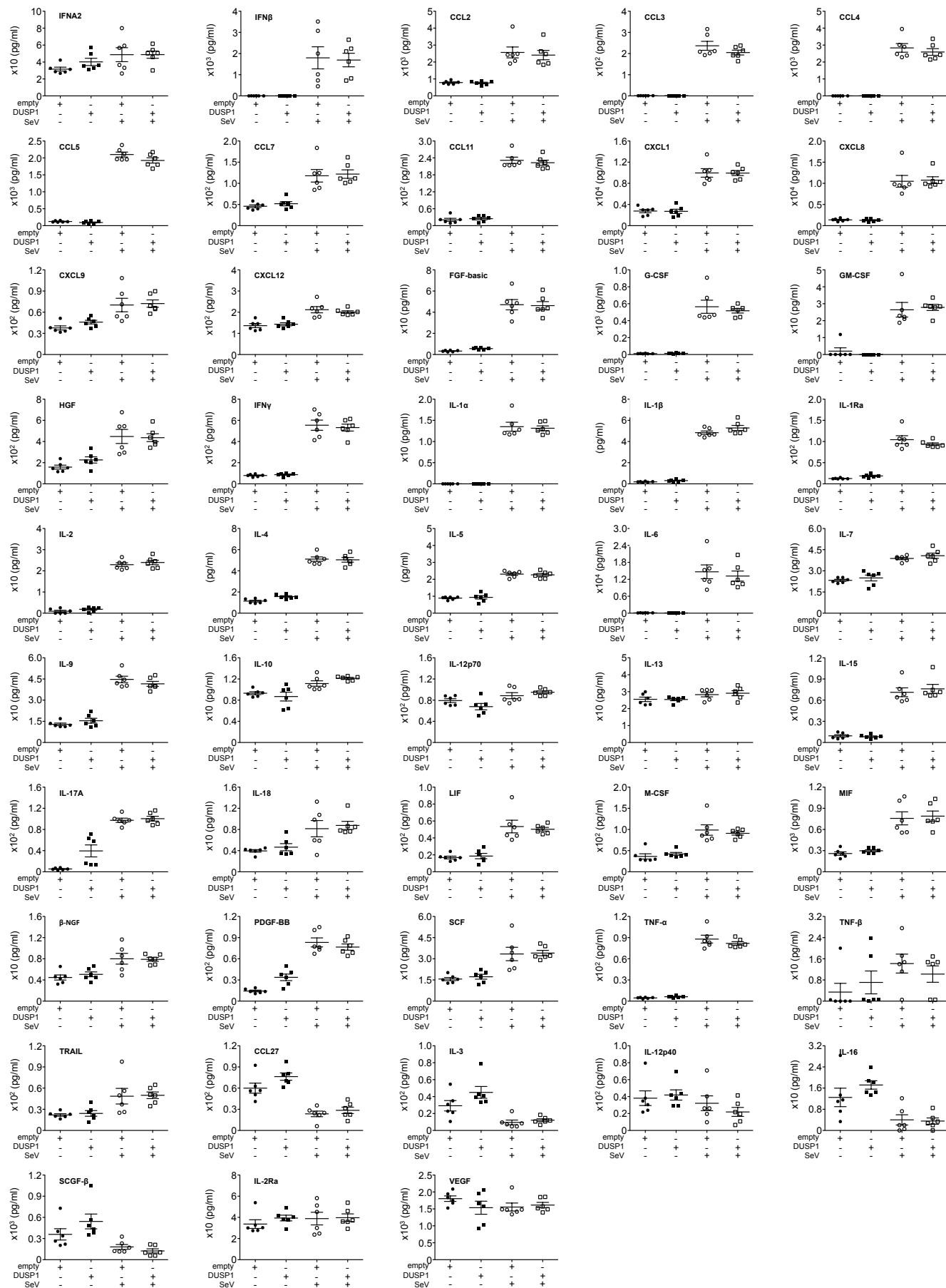
### **4.3.11 Supplementary Figures**

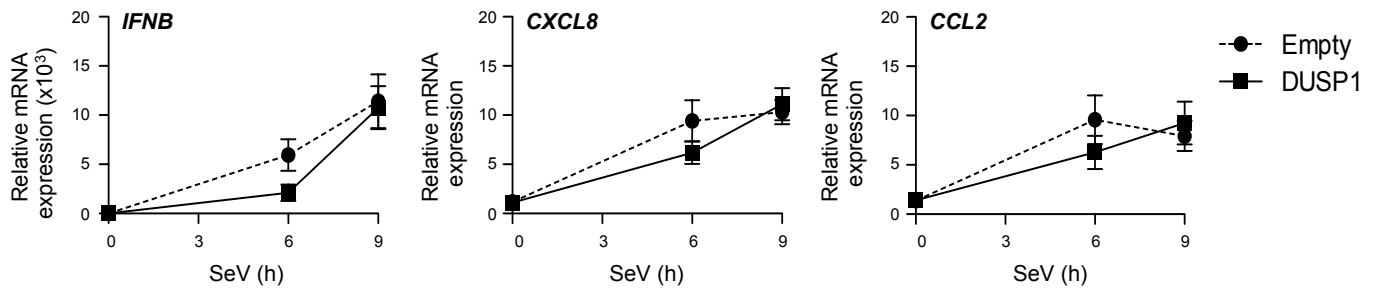


**Figure S1: Cytokine production elicited during SeV and RSV infection is protected from DUSP1-mediated inhibition of JNK and p38.**

A549 cells were either **(A)** pre-treated with DMSO (vehicle) or SB203580 (10  $\mu$ M) + SP600125 (10  $\mu$ M) for 30 min prior to infection, **(B)** transfected with empty or DUSP1-expressing plasmids or **(C and D)** transfected with Control (Ctrl) or DUSP1-specific siRNA before infection with SeV at 40 HAU/ $10^6$  cells **(A to C)** or RSV at MOI of 3 **(D)**. Release of cytokines measured in each biological replicates was quantified using Luminex-based multiplex assays. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of  $n \geq 3$  independent replicates and statistical analyzes were done using unpaired t-test.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) or  $P < 0.001$  (\*\*\*).

**B**

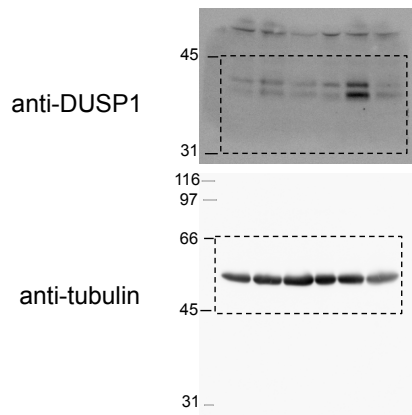




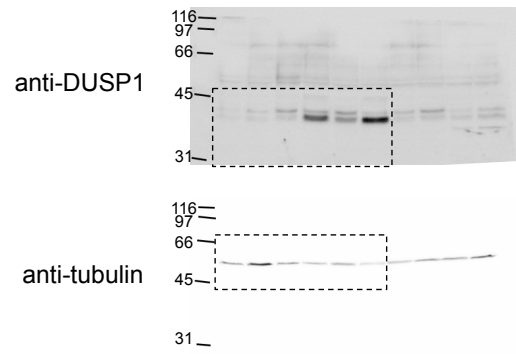
**Figure S2: DUSP1 expression does not alter cytokines mRNA levels induced by SeV infection.**

A549 cells were transfected with an empty- or DUSP1-expressing plasmid before infection with SeV at 5 HAU/10<sup>6</sup> cells for the indicated times. IFN $\beta$ , CXCL8 and CCL2 mRNA levels were quantified by qRT-PCR. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of n=3 independent experiments and analyzed using two-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

**Fig. 1A**

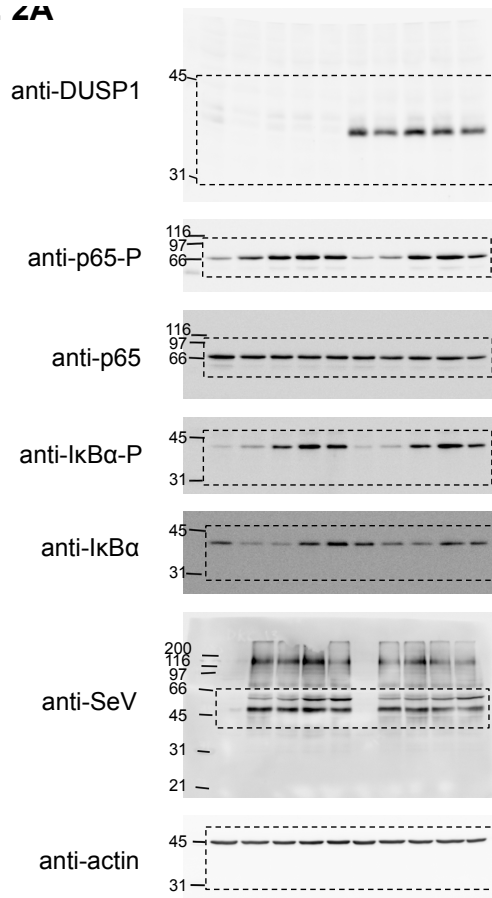


**Fig. 1B**

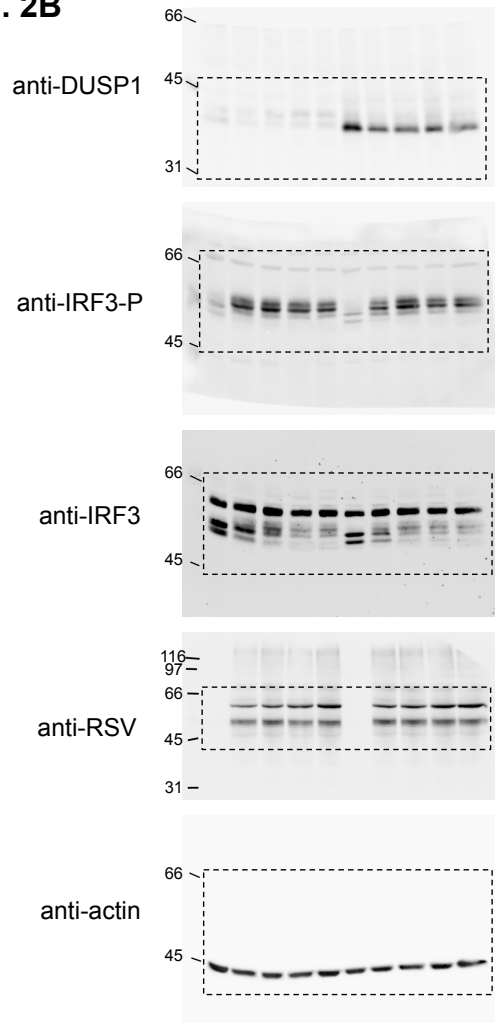


**Figure S3: Full-length blots of Figure 1.**

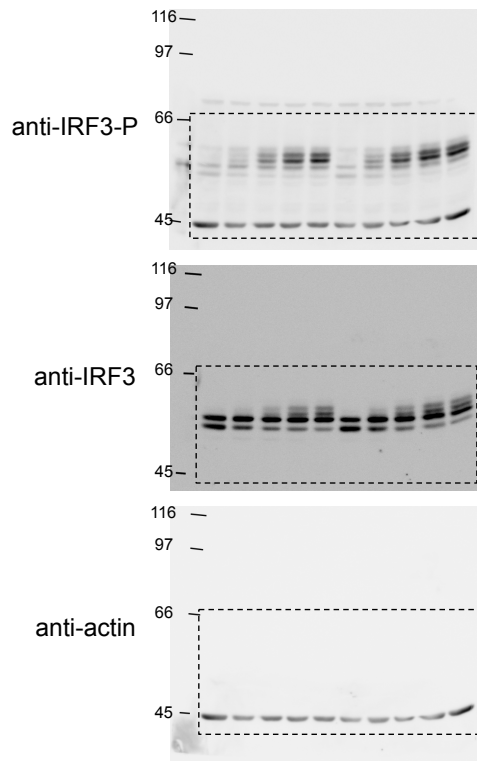
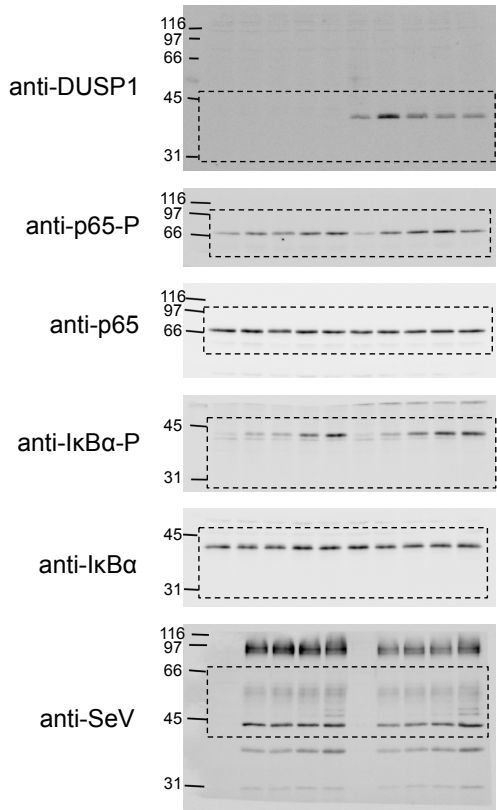
**Fig. 2A**



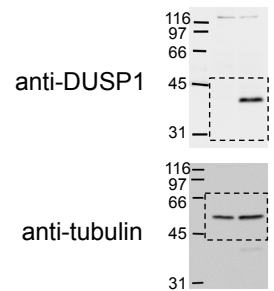
**Fig. 2B**



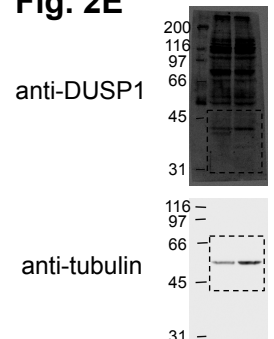
**Fig. 2C**



**Fig. 2D**



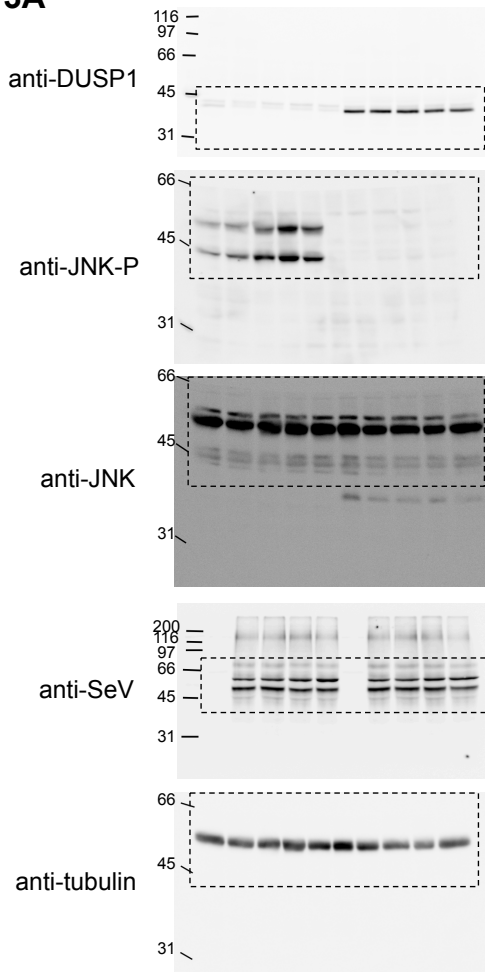
**Fig. 2E**



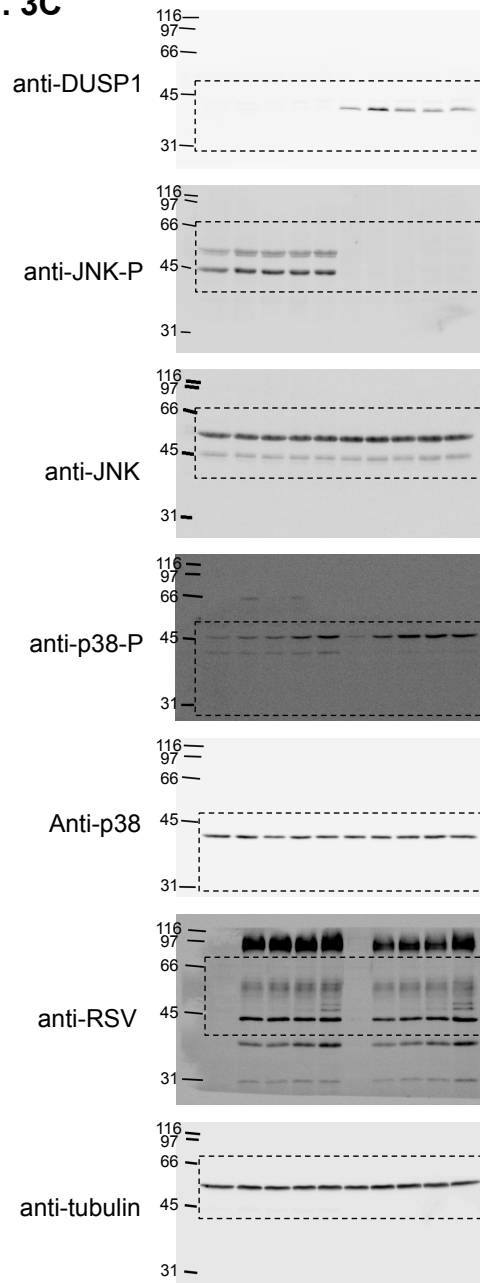
**Figure S4: Full-length blots of Figure 2.**



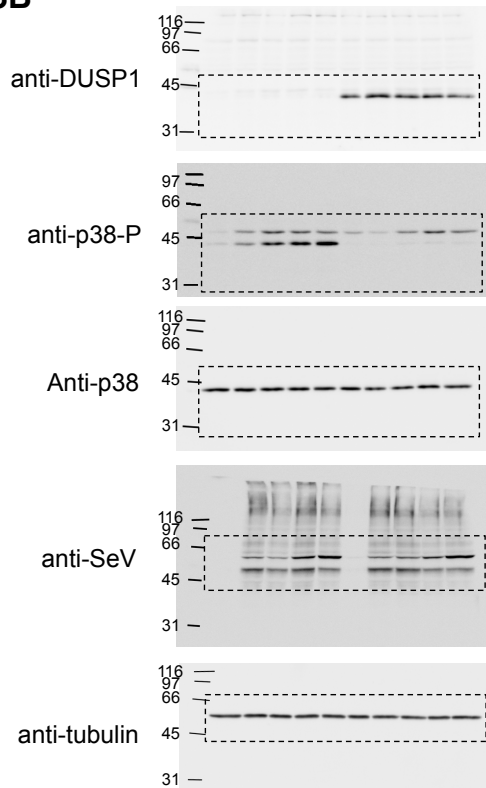
**Fig. 3A**



**Fig. 3C**

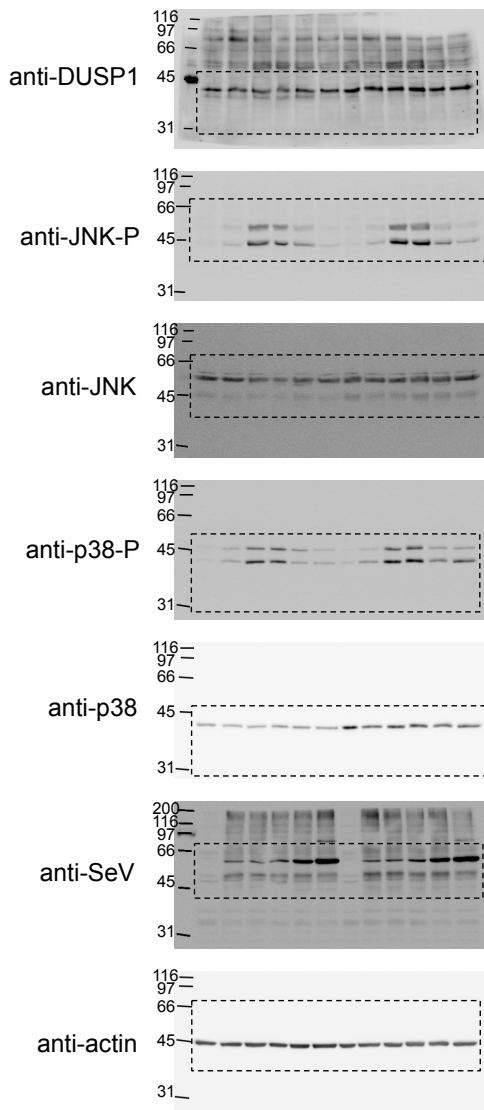


**Fig. 3B**

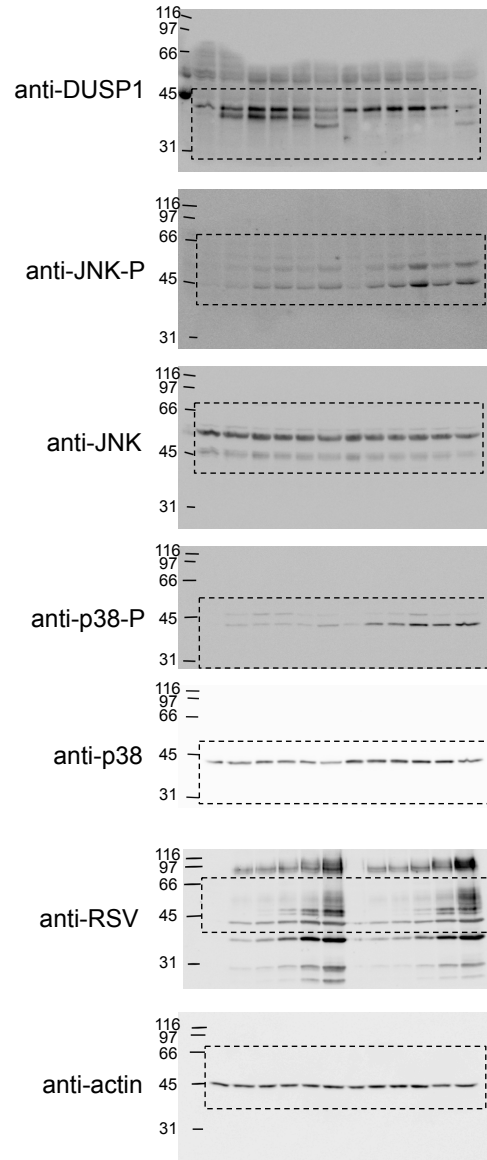


**Figure S5: Full-length blots of Figure 3.**

**Fig. 4A**

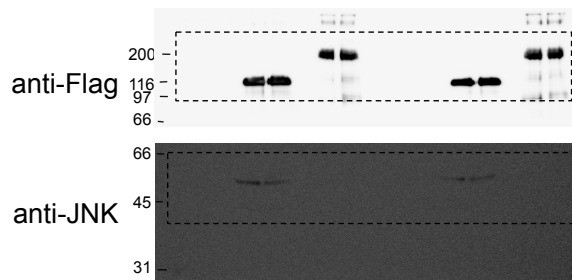
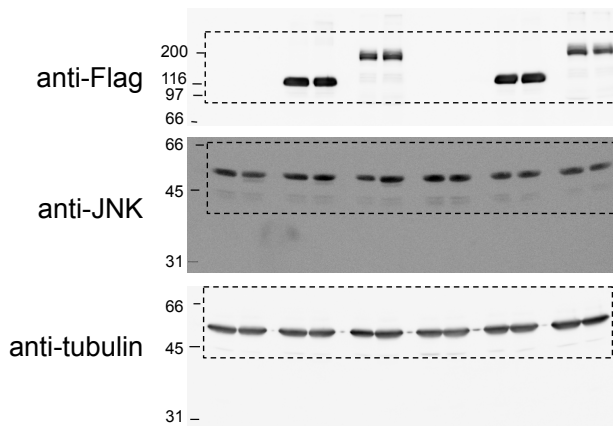


**Fig. 4B**

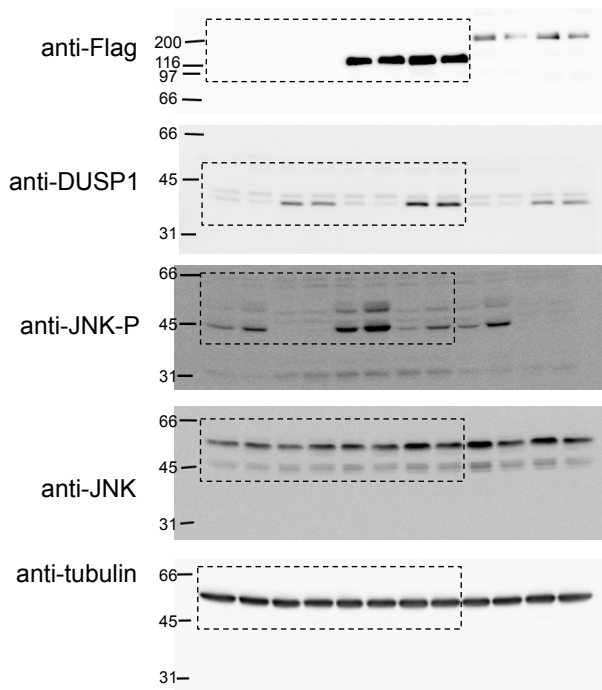


**Figure S6 Full-length blots of Figure 4.**

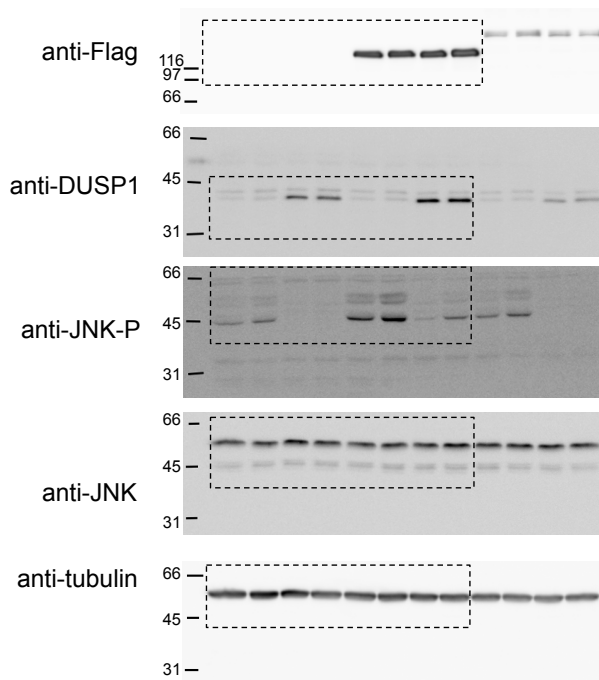
**Fig. 5A**



**Fig. 5B**

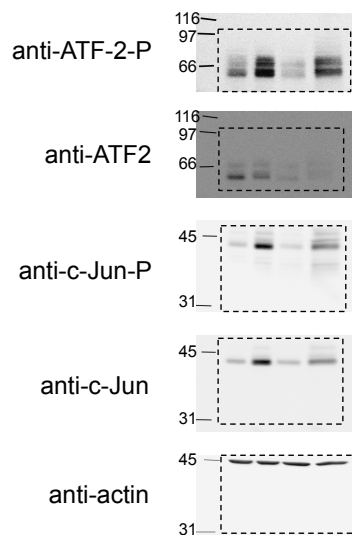


**Fig. 5C**

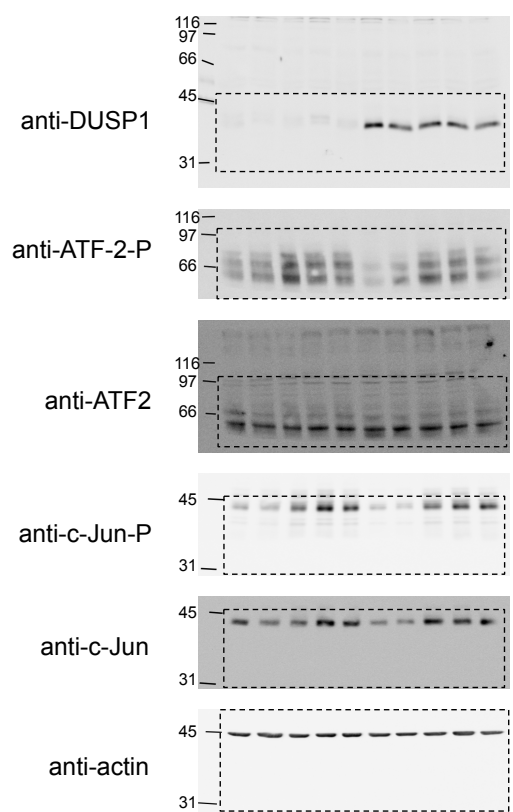


**Figure S7: Full-length blots of Figure 5.**

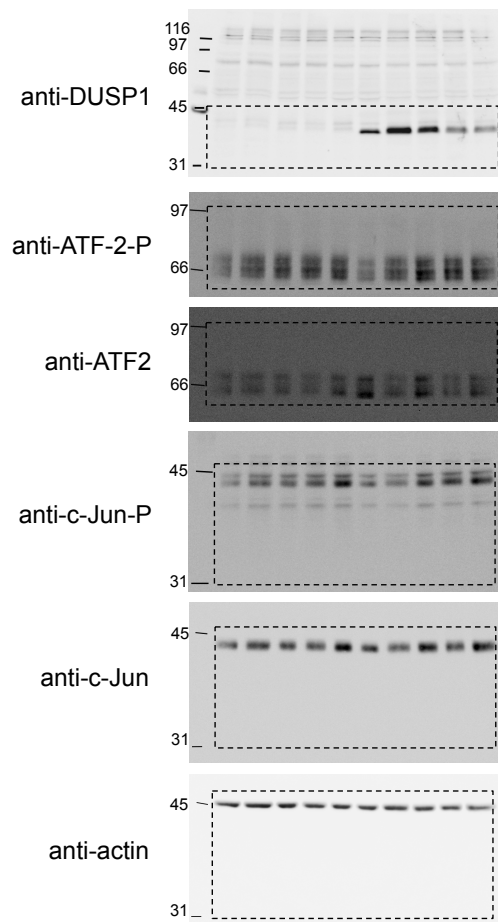
**Fig. 6A**



**Fig. 6B**

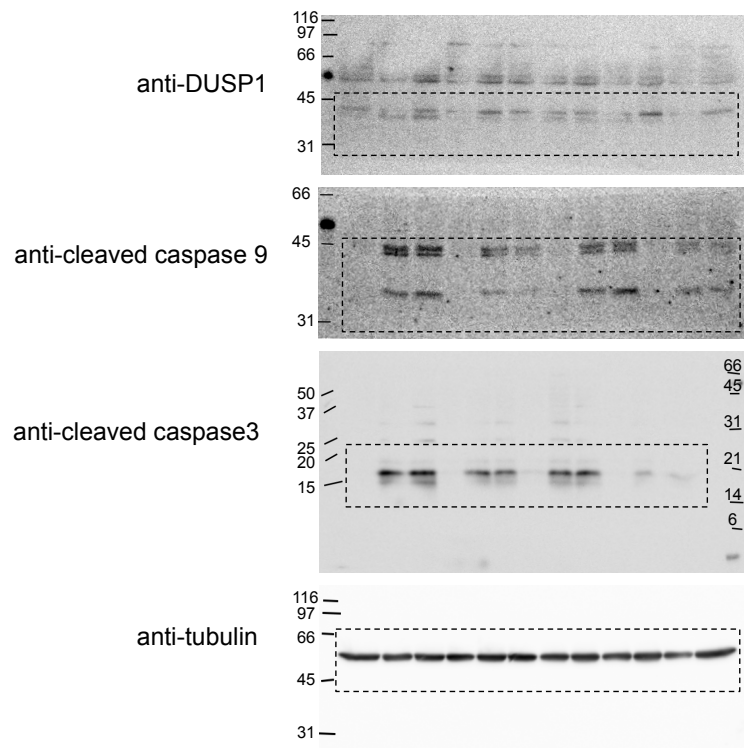


**Fig. 6C**



**Figure S8: Full-length blots of Figure 6.**

**Fig. 7**



**Figure S9: Full-length blots of Figure 7.**

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### MATERIALS AND METHODS

#### qRT-PCR

Specific mRNA levels were quantified by qRT-PCR as described in the Material and Methods using either Fast start SYBR Green Kit (Roche) for *IFNB* (S: gaacttgacatccctgaggagattaagcagc, AS: gttccttaggatttccactctgactatgggtcc) and *IL8* (S: tctcttggcagccttctgatttc, AS: gtgtggccactctcaatcactct) or using TaqMan Gene Expression Assays (Applied biosystems) for *CCL2* (#Hs00234140\_m1). Results were analyzed by the  $\Delta\Delta$ CT method after normalization to S9 mRNA levels (S: cgtctcgaccaagagctga, AS: ggtccttctcatcaagcgtc) or S9 (Hs02339424\_g1) for *CCL2*.

### 4.3.12 Quantification de la Figure 4

Tableau III. Quantification des immunoblots présentés à la Figure 4

Quantification de la Figure 4A (Unités relatives arbitraires)												
SeV (h)	siCtrl						siDUSP1					
	-	3	6	8	12	24	-	3	6	8	12	24
JNK-P / JNK	1,00	3,03	18,10	17,31	5,61	1,88	1,00	4,01	21,09	25,26	7,41	3,61
p38-P / p38	1,00	5,01	15,65	13,43	5,82	6,04	1,00	5,02	26,99	27,14	11,38	11,11

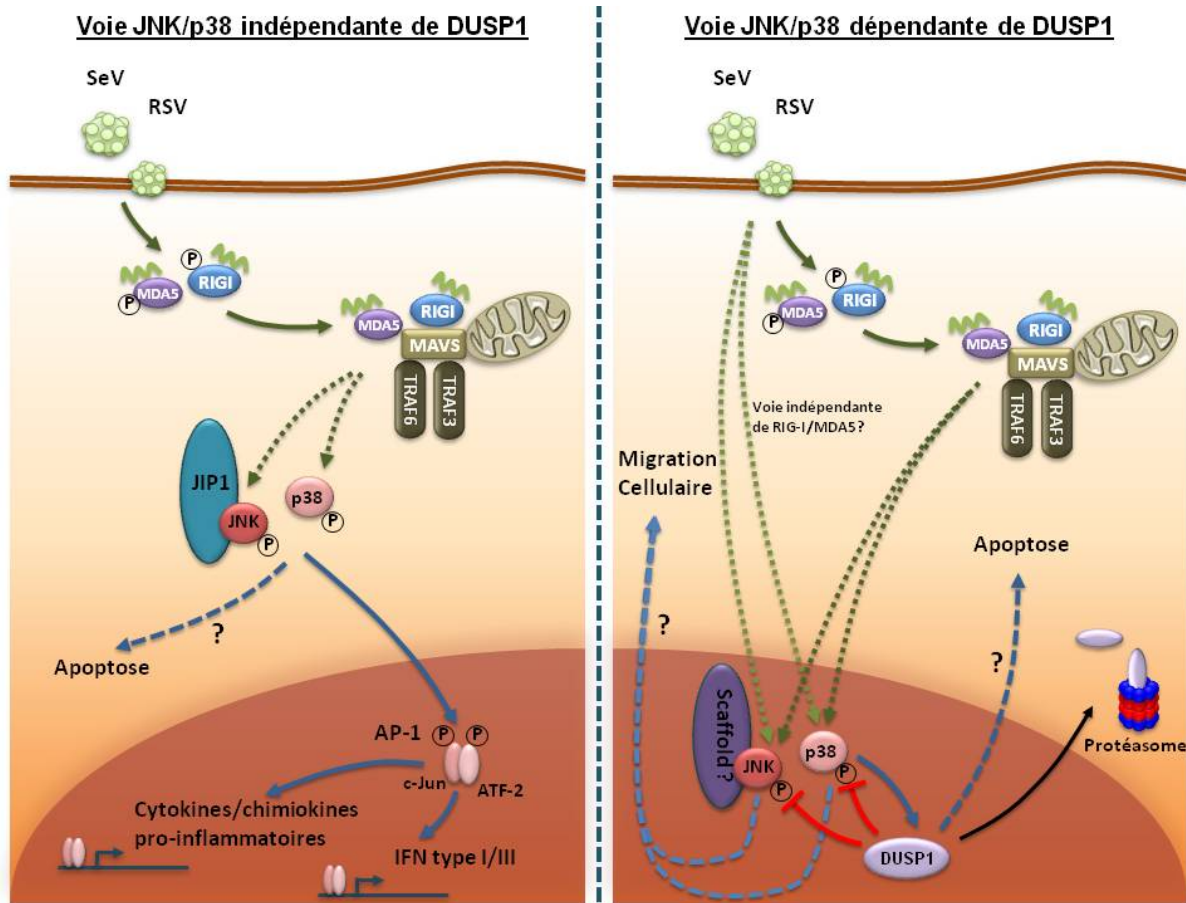
Quantification de la Figure 4B (Unités relatives arbitraires)												
RSV (h)	siCtrl						siDUSP1					
	-	3	6	8	12	24	-	3	6	8	12	24
JNK-P / JNK	1,00	1,82	2,23	2,88	4,33	7,03	1,00	3,86	5,89	7,87	6,58	11,98
p38-P / p38	1,00	2,89	2,36	2,40	3,21	7,97	1,00	3,79	4,39	7,24	7,60	10,15

L'expression de JNK phosphorylé et de p38 phosphorylé a été normalisée sur l'expression de JNK et p38, respectivement. Les données sont représentées en moyenne de n=3 expériences.

## Discussion

Les voies de signalisation modulant les défenses de l'hôte sont dépendantes des événements de phosphorylation qui régulent l'activation des facteurs de transcription IRF3, NF- $\kappa$ B et AP-1. Nous nous sommes intéressés aux phosphatases qui régulent négativement la réponse de l'hôte, puisqu'une défense antivirale et pro-inflammatoire exagérée peut mener à des dommages tissulaires causés entre autres par l'inflammation excessive lors d'infections par des virus comme RSV. Plusieurs phosphatases agissant comme inhibiteurs des voies d'activation d'IRF3/NF- $\kappa$ B suite à des infections virales ont été récemment identifiées [199-205], mais aucune n'a encore été décrite comme régulant la voie AP-1 dans un contexte d'infection par des virus respiratoires. La phosphatase DUSP1 est connue pour son rôle dans la régulation négative de la réponse immunitaire innée via AP-1 principalement en limitant la production de cytokines pro-inflammatoires en contexte d'infection bactérienne ou de défense contre des allergènes [133, 209, 216-219, 226-228]. Cette fonction est due à la capacité de DUSP1 de réguler la durée, l'intensité ainsi que le profil d'activation spatiotemporel de JNK et p38, et dans une moindre mesure d'ERK, en réponse aux ligands des TLR, aux cytokines, aux glucocorticoïdes, aux inhibiteurs de phosphodiesterase-4 (PDE4) et aux « Disease Modifying Antirheumatic Drugs » (DMARD) [229]. D'autre part, le rôle de DUSP1 dans le contexte des infections virales, bien que beaucoup moins connu, a commencé à être défini, notamment en réponse au poly (I:C) et durant l'infection par Coronavirus [218, 224]. Toutefois, l'impact potentiel de DUSP1 sur la réponse innée autonome au cours des infections par les Paramyxovirus ou les Pneumovirus n'a, à notre connaissance, jamais été étudié. Dans ce mémoire, nous présentons une nouvelle fonction de la phosphatase DUSP1 dans la réponse de l'hôte contre les Paramyxovirus SeV et RSV (Figure 6).





**Figure 6. Représentation schématique des voies JNK et p38 induites par SeV et RSV selon les données de cette étude.**

Il existe une voie dépendante et une voie indépendante de DUSP1. Dans la voie indépendante de DUSP1, la phosphorylation de JNK et p38 est induite par SeV et RSV via une voie dépendante de RIG-I/MDA5, mais encore peu caractérisée. Une fois activés, JNK, qui interagit avec JIP1, et p38 phosphorylent c-Jun et ATF2, les deux sous-unités du facteur de transcription AP-1. L'activation d'AP-1, dépendante de JIP1, entraîne l'expression de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires et de gènes antiviraux tels les IFN de type I/III. Par une voie encore non définie, l'activation de JNK et p38 induit l'apoptose. Dans la voie JNK/p38 dépendante de DUSP1, l'activation de JNK et p38 par SeV et RSV pourrait aussi être indépendante de RIG-I/MDA5. Une fois activé, p38 induit l'expression de DUSP1, qui vient déphosphoryler une population spécifique de JNK/p38 associée à une protéine d'échafaudage encore inconnue. En inhibant JNK/p38, DUSP1 bloque ainsi la migration cellulaire dépendante de JNK/p38. DUSP1 induit aussi l'apoptose par une voie encore non caractérisée. DUSP1 est finalement dégradé via le protéasome.

Nous avons démontré que DUSP1 est un régulateur négatif de l'activation de JNK et p38 induite par SeV et RSV. Nos résultats suggèrent également que le pool de JNK lié à la protéine d'échafaudage JIP1 est protégé de la déphosphorylation par DUSP1, laissant l'activation d'AP-1 et l'expression des cytokines en aval intactes. De plus, nous avons démontré que DUSP1 contribue à une voie pro-apoptotique indépendamment de JNK et p38 et

que DUSP1 est un régulateur négatif de la migration cellulaire pendant l'infection. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent un nouveau rôle de DUSP1 dans la réparation et l'homéostasie des tissus durant l'infection par des virus respiratoires. Nos résultats sur l'inhibition d'ATF2/c-Jun et la diminution concomitante de la production de cytokines dues à l'inhibition de JNK/p38 à l'aide d'inhibiteurs spécifiques (Robitaille *et al.* Figures 6A et 6D) confirment plusieurs études précédentes. En effet, l'existence d'une voie de signalisation induite par une infection virale menant à l'expression de cytokines en passant par l'activation de JNK/p38 et d'AP-1 a déjà été démontrée [76, 102, 103]. De manière surprenante, ni ATF2/c-Jun, ni la multitude de cytokines induites au cours de l'infection par SeV et RSV ne sont affectés par la phosphatase DUSP1 (Robitaille *et al.* Figures 6B, 6C, 6E, 6F et 6G), bien qu'elle régule négativement l'activation de JNK et p38. De ce fait, nous avons émis l'hypothèse qu'il existait différentes populations de JNK/p38 et que DUSP1 régula spécifiquement l'une de ces populations. Différentes populations de JNK/p38 se distinguent selon leur interaction avec des protéines d'échafaudage spécifiques. Les protéines d'échafaudage ont la particularité de moduler de manière temporelle et spatiale l'assemblage de complexes de protéines en régulant les concentrations locales, la proximité, l'emplacement dans certains compartiments et les propriétés biochimiques de leurs protéines cibles [152]. Les protéines d'échafaudage de la famille des JIP interagissent avec différentes populations de JNK afin de les rendre disponibles pour des activateurs spécifiques en amont ainsi que les substrats appropriés en aval [153, 230]. Ces différentes JIP assurent l'activation de fonctions distinctes et spécifiques par JNK. Plusieurs protéines d'échafaudage ont également été décrites comme interagissant spécifiquement avec p38 pour réguler positivement son activation dans différents contextes. Parmi celles-ci, on compte JIP2, JIP4, JLP, « Osmosensing Scaffold for MEKK3 » (OSM), « B-cell Lymphoma 10 » (Bcl-10), MEKK1 et « Disks Large Homologue 1 » (DLG1) [152, 169-171, 182, 231-234]. Cependant, l'activation de JNK et de p38 durant l'infection virale, notamment au cours de l'infection par RSV ou SeV, n'a à notre connaissance pas encore été associée à une protéine d'échafaudage en particulier. Dans notre étude, nous montrons que JNK interagit avec JIP1 au niveau basal et pendant l'infection virale (Robitaille *et al.* Figure 5A), mais qu'il n'interagit pas avec JIP3. Nous avons choisi d'étudier l'interaction de JNK avec JIP1 et JIP3 en particulier, puisqu'elles sont surexprimées dans les cellules épithéliales pulmonaires [154, 173-175]. Par contre, JIP2 et JIP4 ne sont exprimées que dans le cerveau et

dans les testicules, respectivement [168, 180, 181]. De manière intéressante, nous montrons pour la première fois que la co-expression de JIP1 et de DUSP1 diminue la régulation négative de JNK médiée par DUSP1 (Robitaille *et al.* Figures 5B, 5C et 5D). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que par son interaction avec JNK, JIP1 protège JNK de la déphosphorylation médiée par DUSP1 en le séquestrant dans une autre voie, bien qu'il puisse exister d'autres explications. Ce modèle semble être le plus probable, puisqu'il est supporté par le fait que JNK est retenu dans le cytoplasme en présence de JIP1 [154, 157]. La localisation de JNK dans le cytoplasme pourrait représenter un mécanisme de protection contre sa régulation négative médiée par DUSP1. En effet, DUSP1 est une phosphatase nucléaire [235-237]. La déphosphorylation de JNK/p38 médiée par DUSP1 dans le compartiment nucléaire a également été documentée [238]. Il est donc très probable que JIP1 retienne JNK dans le cytoplasme, le rendant indisponible pour sa déphosphorylation médiée par DUSP1 dans le noyau. Pour le moment nous pouvons exclure un rôle de DUSP1 vis-à-vis de p38, car JIP1 n'interagit pas avec p38 [187] (AR et NG, données non présentées). Il serait intéressant de déterminer quelle protéine d'échafaudage parmi celles énumérées ci-dessus assure l'activation de p38 pendant l'infection virale. De la même manière qu'avec JIP1, nous pourrions déterminer si une certaine protéine d'échafaudage de p38 le protège de sa désactivation médiée par DUSP1. Afin de compléter ce modèle, il serait d'autant plus pertinent de trouver quelles protéines d'échafaudage alternatives interagissent avec les populations de JNK et de p38 qui sont déphosphorylées par DUSP1 pendant l'infection SeV et RSV. Dans le cas de JNK, on peut exclure JIP1 et JIP3 et il serait peu probable qu'il s'agisse de JIP2 ou JIP4 tel que mentionné ci-dessus. On peut aussi exclure la protéine d'échafaudage POSH, puisqu'elle est impliquée dans la fonction pro-apoptotique de JNK [161]. Cependant, il a été montré que MEKK1 peut agir comme protéine d'échafaudage de JNK sans interagir avec d'autres protéines d'échafaudage [239]. Il serait donc possible que MEKK1 chapeaute la population de JNK ciblée par DUSP1. Finalement, à notre connaissance, seules les protéines d'échafaudage décrites ci-dessus ont été identifiées pour médier l'activation de JNK [153, 240]. Toutefois, il est possible que JNK interagisse avec une protéine d'échafaudage qui n'a pas encore été identifiée. Dans un autre ordre d'idées, les résultats de cette étude ne montrent pas si l'augmentation de la phosphorylation de JNK lorsque JIP1 et DUSP1 sont co-exprimés est significative biologiquement. Pour répondre à cette question, il serait pertinent de mesurer

certaines cytokines dépendantes de JNK, l'activation de c-Jun ou même l'activité kinase de JNK en présence de JIP1 et de DUSP1, par exemple. Évidemment, en contexte de surexpression de JIP1, les niveaux d'expression de JIP1 ne sont pas physiologiques. Pour tester l'impact de JIP1 sur la déphosphorylation de JNK par DUSP1 à un niveau d'expression physiologique, il faudrait inhiber l'expression endogène de JIP1. Cependant, DUSP1 déphosphoryle la grande majorité de JNK phosphorylé détectable, alors il serait difficile de mesurer une diminution de la phosphorylation de JNK en absence de JIP1 et en présence de DUSP1 pour confirmer l'impact de JIP1 sur la déphosphorylation de JNK par DUSP1.

Plusieurs études s'entendent sur le rôle essentiel de JIP1 dans l'activation de la voie JNK-AP-1 qui contrôle l'expression de cytokines [155, 158, 166, 167]. Nos données montrent que DUSP1 ne régule ni l'activation d'AP-1, ni la production de cytokines qui orchestrent les réponses antivirales et pro-inflammatoires lors de l'infection par SeV et RSV (Robitaille *et al.* Figures 6B, 6C, 6E, 6F et 6G). Cette observation nous permet donc d'envisager que la voie JNK-AP-1 induite par SeV et RSV menant à la production de cytokines serait protégée de la régulation négative médiée par DUSP1 grâce à la rétention de JNK dans le cytoplasme. Cependant, nos résultats diffèrent de certaines études qui ont montré auparavant que DUSP1 régule négativement l'expression de certaines cytokines en contexte d'infection virale. En effet, il a été montré que DUSP1 régule l'expression d'IL-6 et de CXCL8 suite à la stimulation par le poly (I:C) et par Coronavirus [218, 224]. Le poly (I:C), reconnu par le TLR3, RIG-I et MDA5 [241-243], est un ARNdb synthétique qui mime l'ARNdb viral, un intermédiaire de réplication chez les virus à ARNsb. De plus, des souris déficientes en DUSP1 montrent une expression de cytokines pro-inflammatoires augmentée en réponse au virus de la vaccine atténué comparativement aux souris contrôles [225]. L'inhibition de DUSP1 a aussi pour effet de bloquer la réplication du virus de l'hépatite C en augmentant l'induction de certains ISG, comme CXCL10, USP18, OAS1 et ISG15 [244]. Pour expliquer cette différence, nous pouvons supposer que certains virus bloquent le complexe JIP1-JNK, permettant à DUSP1 de déphosphoryler JNK, ce qui aurait pour effet de diminuer l'activation d'AP-1 et la production de cytokines en aval. Dans certains contextes, cela pourrait être un mécanisme favorisant la pathogenèse, puisqu'en induisant la dissociation du complexe JIP1-JNK, le virus pourrait ainsi échapper aux réponses antivirales et pro-inflammatoires, car celles-ci seraient atténuées par

DUSP1. Cependant, à notre connaissance, aucun virus n'a jusqu'ici été décrit comme ayant la capacité d'inhiber l'interaction JIP1-JNK. Toutefois, il est intéressant de noter que la kinase B1R du virus de la vaccine interagit avec JIP1 et qu'elle augmente son interaction avec JNK, menant à une augmentation de l'activation de c-Jun [245]. Cette observation démontre que l'interaction JIP1-JNK est ciblée dans certains contextes d'infection virale. Peut-être dans le futur trouverons-nous d'autres virus ayant la capacité de moduler l'interaction entre JIP1 et JNK de manière favorable ou défavorable à leur pathogenèse, dépendamment si la pathogenèse virale est favorisée ou défavorisée par une production de cytokines atténuée. Dans le contexte de l'infection par SeV ou RSV (Robitaille *et al.* Figure 5A), nous n'avons pas observé de modulation de l'interaction JIP1-JNK au cours de l'infection, ce qui nous laisse supposer que ces virus ne bloquent pas l'interaction JIP1-JNK.

Une réponse antivirale exagérée, marquée par une production excessive de cytokines, peut entraîner des dommages tissulaires et ainsi contribuer à la pathogenèse des virus [246]. Nos résultats suggèrent que dans l'infection par RSV et SeV, DUSP1 n'a aucun impact sur la réponse aux cytokines grâce à l'interaction de JIP1 avec une population de JNK, tel que discuté ci-dessus. Cela ouvre la porte pour une cible thérapeutique spécifique. L'interaction JIP1-JNK est de plus en plus considérée comme une cible thérapeutique dans des contextes variés, comme le diabète et les ischémies cérébrales [163, 165]. En effet, plusieurs ont découvert que des petites molécules ou peptides, principalement dérivés du domaine interagissant avec JNK de JIP1, avaient la capacité d'inhiber l'activation de JNK. Bonny *et al.* et Borsello *et al.* ont montré que les peptides inhibiteurs de JNK (JNKI1 et JNKI2), dérivés des domaines d'interaction de JIP1 et JIP2 avec JNK inhibaient spécifiquement l'activation de c-Jun [163, 165]. L'équipe de Dr Bogoyevitch a aussi caractérisé un peptide inhibiteur de JNK dérivé du domaine d'interaction avec JNK de JIP1 (I-JIP1) ayant la capacité d'inhiber c-Jun ainsi qu'ATF2 [164]. La molécule BI-78D3 bloque l'activation de JNK *in vivo* et dans les cellules Hela par compétition pour l'interaction de JIP1 avec JNK [162]. Toutes ces molécules miment en fait JIP1 et entrent en compétition pour l'interaction avec JNK, inhibant ainsi l'activation de certains substrats spécifiques de JNK, comme ATF-2 et c-Jun. Comparativement aux inhibiteurs qui ciblent des sites liant l'ATP qui sont très conservés, ces petites molécules sont substrat-spécifiques, ce qui ouvre l'avenue pour des cibles

thérapeutiques spécifiques [162]. Ces molécules inhibent l'activation de JNK et jouent un rôle protecteur dans certaines pathologies dépendantes de JNK, comme le diabète et les ischémies cérébrales [162, 165]. Il a été montré que les peptides inhibiteurs JNKI1 et JNKI2 étaient rapidement intégrés dans les cellules  $\beta$  pancréatiques grâce à leur combinaison avec 10 acides aminés du gène *Tat* du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), qui favorise l'import cellulaire, entre autres de macromolécules dans des tissus animaux [163, 247]. Cependant, à notre connaissance, aucune de ces molécules n'est testée en étude clinique à ce jour. Dans notre modèle, on peut supposer qu'en inhibant la formation du complexe JIP1-JNK pendant l'infection par RSV ou SeV, on permettrait à DUSP1 de réguler négativement JNK, AP-1 et la production de cytokines qui en découle, sans toutefois affecter les autres fonctions de JNK qui sont indépendantes de JIP1. Cette stratégie serait pertinente dans le contexte des infections par les Paramyxovirus ou les Pneumovirus tels que RSV, puisque ces virus engendrent une production excessive de cytokines entraînant de graves dommages aux poumons. En permettant à DUSP1 de déphosphoryler la population de JNK qui interagit habituellement avec JIP1, on arriverait sans doute à diminuer significativement l'expression de cytokines pro-inflammatoires et antivirales. Pour tester cette hypothèse et confirmer notre modèle, l'emploi d'une des petites molécules inhibitrices de l'interaction JIP1-JNK décrites ci-dessus permettrait de cibler spécifiquement la population de JNK qui est potentiellement protégée de la déphosphorylation médiée par DUSP1 lors de l'infection virale. Une des limites d'une telle stratégie est qu'il est impossible de savoir à quel point la production de cytokines diminuerait en inhibant l'interaction JIP1-JNK à l'aide d'un peptide inhibiteur spécifique, surtout *in vivo*. Il est difficile de prévoir si la production de cytokines diminuerait assez pour voir un effet bénéfique pour l'hôte contre les Paramyxovirus ou les Pneumovirus quant aux dommages pulmonaires ou si, au contraire, elle serait inhibée complètement, empêchant l'activation de la réponse antivirale et inflammatoire, ce qui permettrait au virus de prendre le dessus et empêcherait la résolution de l'infection. Tester cette hypothèse dans un modèle animal comme la souris permettrait de répondre à ces questions.

Dans notre effort pour trouver de nouvelles fonctions régulées par DUSP1 dépendantes de JNK/p38, nous avons évalué l'impact de DUSP1 sur la prolifération cellulaire ainsi que sur l'apoptose, qui font partie des autres mécanismes cellulaires majeurs connus pour être régulés

par JNK et p38 [150]. Nos observations lors d'analyses du cycle cellulaire montrent que l'expression ectopique ou l'inhibition de DUSP1 n'a aucun effet significatif sur la prolifération cellulaire pendant l'infection par SeV ou RSV (AR et NG, données non présentées). On peut supposer que la régulation de la prolifération cellulaire repose donc aussi sur l'activation d'une population spécifique de JNK/p38 qui serait à l'abri de la régulation négative par DUSP1. Nous avons ensuite regardé l'impact de JNK et p38 sur l'apoptose induite par SeV. Nos résultats vont dans le même sens que plusieurs études précédentes démontrant les fonctions pro-apoptotiques de JNK et p38 [118, 143, 144]. En effet, nous avons aussi observé une diminution du nombre de cellules apoptotiques induites par SeV lorsque JNK et p38 étaient inhibés à l'aide des inhibiteurs commerciaux SP600125 et SB203580 (Robitaille *et al.* Figure 7A). Nous voulions alors déterminer si cette fonction pro-apoptotique de JNK/p38 était dépendante de DUSP1. Notre hypothèse était qu'en inhibant l'expression de DUSP1 avec des ARN interférents, nous observerions une augmentation du nombre de cellules apoptotiques, puisque l'inhibition de DUSP1 entraîne une augmentation de l'activation de JNK et p38. Nos résultats montrent toutefois que l'inhibition de DUSP1 induit une diminution de l'apoptose pendant l'infection par SeV (Robitaille *et al.* Figures 7A et B). Contrairement à notre hypothèse, DUSP1 jouerait un rôle pro-apoptotique, probablement en inhibant une voie anti-apoptotique ou encore en activant une voie pro-apoptotique. Bien que nous ne puissions pas exclure d'autres mécanismes, ces résultats portent fortement à penser que DUSP1 régule l'apoptose de manière JNK/p38 indépendante durant l'infection par les Paramyxovirus. En effet, si la fonction pro-apoptotique de JNK/p38 était inhibée par DUSP1, nous observerions un phénotype anti-apoptotique de DUSP1. Comme le phénotype contraire est observé, cela porte à croire que DUSP1 régule l'apoptose indépendamment de ses substrats JNK et p38. Il serait cependant pertinent de confirmer le rôle pro-apoptotique de DUSP1 par d'autres techniques comme les shRNA ou l'édition CRISPR/Cas9. Une question non résolue persiste, à savoir quelle voie de signalisation pro-apoptotique ou anti-apoptotique est modulée par DUSP1 au cours de l'infection par SeV. Pour répondre à cette question et confirmer notre modèle, il serait donc pertinent d'identifier la voie de signalisation par laquelle l'apoptose DUSP1-dépendante est induite. Il s'agit sans doute d'une voie autre que celle dépendante de MAVS-MKK7-JNK [118], puisque DUSP1 semble induire l'apoptose indépendamment de JNK. Une étude a montré qu'en surexprimant DUSP1 dans des cellules NSCLC résistantes au

gefitinib, traitement anticancéreux et inhibiteur de la tyrosine kinase d'EGFR, cela rétablissait leur « sensibilité » au gefitinib par l'inhibition de la voie de signalisation d'EGFR et par l'induction de l'apoptose. La surexpression de DUSP1 induisait non seulement l'inhibition de la phosphorylation d'EGFR, mais aussi d'ERK et d'Akt [248]. Il serait donc possible que le rôle pro-apoptotique de DUSP1 puisse être expliqué par un changement d'activité d'ERK, par exemple. Nous pourrions par conséquent tester si la surexpression de DUSP1 induit la déphosphorylation d'EGFR, d'ERK et d'Akt pendant l'infection par SeV ou RSV ou si, au contraire, l'inhibition de DUSP1 provoque une augmentation de la phosphorylation d'EGFR, d'ERK et d'Akt. ERK régule la voie de signalisation cellulaire apoptotique intrinsèque ainsi que la voie apoptotique extrinsèque. La voie intrinsèque repose sur l'activation du cytochrome c et la voie extrinsèque est dépendante de la caspase 8 [249]. Nos résultats suggèrent que DUSP1 induit l'apoptose en régulant la voie apoptotique intrinsèque, puisque l'inhibition de DUSP1 entraîne une diminution du clivage de la caspase 9, impliquée dans la voie apoptotique intrinsèque en réponse à l'infection par SeV [250] (Robitaille *et al.* Figure 7B). Toutefois, afin d'obtenir plus d'information sur la voie apoptotique modulée par DUSP1, il serait intéressant de déterminer si la surexpression ou l'inhibition de DUSP1 active ou inhibe le cytochrome c et/ou la caspase 8, ainsi que les protéines pro-apoptotiques comme Bax et les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et « B-cell Lymphoma-Extra Large » (Bcl-XL). D'autre part, puisque la fonction pro-apoptotique de JNK/p38 semble protégée de la déphosphorylation médiée par DUSP1, on peut supposer qu'elle soit elle aussi dépendante de l'interaction JIP1-JNK. Des études ont d'ailleurs déjà montré une voie pro-apoptotique dépendante du complexe JIP1-JNK dans des neurones exposés au stress [158, 188]. En effet, il a été montré que les souris déficientes en JIP1 ainsi que les neurones primaires de l'hippocampe déficients en JIP1 présentaient une diminution de l'apoptose induite par l'endotoxine kainate comparativement aux souris et aux cellules contrôles [158]. De plus, il a été démontré que le stress endotoxique induit une diminution de l'interaction d'Akt1 avec JIP1, permettant l'interaction entre JIP1 et JNK, ce qui entraîne l'apoptose des cellules neuronales [188]. Ce modèle irait aussi dans le même sens que les études montrant une voie pro-apoptotique induite par SeV et passant par MAVS-MKK7-JNK, puisque JIP1 est connue pour faciliter la voie d'activation MLK3-MKK7-JNK [118, 157]. D'autant plus, les petits peptides inhibiteurs JNKI1 et JNKI2 utilisés pour bloquer l'interaction JIP1-JNK inhibent l'apoptose induite par IL-1 $\beta$  [163] et protègent de



la mort neuronale lors d'ischémies cérébrales [165]. De plus, il a été montré que la protéine d'échafaudage POSH interagit avec JIP1, menant à l'activation de la fonction pro-apoptotique de JNK [160]. Pour déterminer si la voie pro-apoptotique de JNK/p38 était bel et bien dépendante de JIP1 dans l'infection par les Paramyxovirus, nous pourrions surexprimer JIP1 et vérifier si nous observons un phénotype pro-apoptotique ou encore inhiber l'interaction JIP1-JNK à l'aide d'un peptide inhibiteur comme JNKI1 et confirmer si nous observons une diminution de l'apoptose.

Nos résultats montrent que lorsque DUSP1 est absent, les cellules infectées par RSV migrent plus rapidement et beaucoup plus loin comparativement aux cellules dans lesquelles DUSP1 est présent (Robitaille *et al.* Figure 8). L'observation de la migration des cellules sur une longue période porte à penser que cette migration cellulaire, qui est fortement augmentée en absence de DUSP1, semble venir, en partie, d'une quantité ou un ratio plus élevé de cellules migratoires. Il serait en effet intéressant de mesurer le nombre de cellules formant des protrusions comparativement au nombre de cellules totales dans les deux conditions. De plus, puisque les cellules migrent sur de plus longues distances lorsque DUSP1 est inhibé, il serait aussi intéressant de mesurer la longueur de ces protrusions en présence et en absence de DUSP1 pour déterminer si des protrusions plus longues entraînent une migration plus rapide et plus éloignée des cellules. La migration cellulaire se fait grâce à un réarrangement de microtubules et de filaments d'actine, qui permettent à la cellule de se déformer pour former des protrusions qui lui permettront de migrer dans une direction donnée [251, 252]. Il serait donc intéressant de marquer les filaments d'actine à l'aide de la phalloïdine afin de pouvoir mieux observer en microscopie confocale la différence dans la formation des protrusions qu'on aperçoit en absence de DUSP1 *versus* en présence de DUSP1. La migration cellulaire requiert aussi l'assemblage de plaques d'adhésions focales et de complexes focaux aux points d'ancrage de la cellule [251, 252]. FAK est un régulateur important des adhésions focales. Elle est activée par phosphorylation au résidu Tyr397 et induit l'activation de différentes voies de signalisation menant à la migration cellulaire. FAK s'associe avec Src pour activer une voie de signalisation dépendante de « Crk-Associated Substrate » (Cas)-Crk ainsi que des voies dépendantes de la paxilline (Pax), Pax-Crk et Pax-« Paxillin Kinase Linker » (PKL)/PIX, qui mènent ultimement à l'activation de Rac, qui induit la contraction de la cellule ainsi que la

polymérisation de l'actine pour former des filaments. Des voies alternatives impliquant le domaine SH2 de PI3K, phospholipase C (PLC)  $\gamma$  et « Growth Factor Receptor Bound Protein 7 » (Grb7) ou le domaine SH3 de « GTPase Regulator Associated with FAK » (GRAF) et « Arf-GAP with SH3 Domain, ANK Repeat and PH Domain-Containing Protein 1 » (ASAP1) entraînent, quant à elles, la survie cellulaire et la régulation de GTPases de la famille des Rho. Finalement, les protéines vinculine, taline et actinine du cytosquelette se retrouvent aussi principalement au niveau des plaques d'adhésion focales [251, 252]. Il serait donc plus que pertinent de faire du marquage pour des protéines comme FAK phosphorylé (Tyr397), Pax phosphorylé (Tyr31 et Tyr118) et Cas phosphorylé ou encore pour la vinculine, la taline et l'actinine pour observer les plaques d'adhésion focales en microscopie confocale dans les cellules avec ou sans DUSP1. Ces observations pourraient nous donner des indices afin d'identifier la voie pro-migratoire qui est inhibée par DUSP1 dans l'infection par RSV et ainsi pouvoir approfondir notre modèle. JNK et p38 sont connus pour jouer un rôle dans la migration cellulaire dans différents contextes, et ce, de manière AP-1 indépendante. En effet, JNK phosphoryle « Doublecortin » (DCX), Spir, « Microtubules-associated proteins » (MAPs) et Pax, tandis que p38 phosphoryle MAPKAPK2/3, Pax et la caldesmone. L'activation de ces substrats distincts par JNK et p38 mène à la régulation coordonnée de la dynamique d'adhésion focale et de la réorganisation des microtubules ainsi que des filaments d'actine [145]. Cela suggère donc que DUSP1 joue un rôle crucial dans la régulation négative de la migration cellulaire via l'inhibition de JNK/p38. Or, une des questions non résolues de notre étude est : est-ce que DUSP1 bloque la migration cellulaire via l'inhibition de JNK/p38? Une expérience de migration similaire, cette fois-ci en inhibant JNK et p38 à l'aide des inhibiteurs SP600125 et SB203580 en plus de l'inhibition de DUSP1 par les ARN interférents, nous confirmerait si la voie anti-migratoire de DUSP1 est bien dépendante de l'inhibition de JNK et p38. En effet, si les cellules infectées par RSV reviennent à leur phénotype initial en présence des inhibiteurs de JNK/p38, c'est-à-dire que la migration cellulaire est inhibée, cela confirmerait notre hypothèse sur l'implication de JNK et p38 dans la voie anti-migratoire de DUSP1. À l'opposé, nous pourrions aussi induire la surexpression de JNK et p38 à l'aide de plasmides spécifiques et vérifier si un phénotype pro-migratoire est observé. Cependant, il est possible que DUSP1 inhibe la migration cellulaire via un substrat autre que JNK ou p38. De la même façon, il serait intéressant de déterminer si le rôle de DUSP1 dans la migration

cellulaire est dépendant d'ERK. Finalement, le rôle pro-migratoire de DUSP1 pourrait potentiellement aussi provenir d'un substrat de DUSP1 encore inconnu.

La pathogenèse des virus est aggravée par les lésions des tissus causées non seulement par le virus, mais surtout par une réponse exagérée des cellules de l'immunité innée. Par exemple, l'infection RSV entraîne un recrutement excessif de neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages, attirés par une production exagérée de cytokines pro-inflammatoires, causant des dommages aux poumons [14, 21, 22]. La migration cellulaire ainsi que l'apoptose jouent alors un rôle primordial dans la pathogenèse des virus respiratoires, puisqu'ils influencent non seulement la réplication et la dissémination des virus, mais aussi la balance entre les dommages et la réparation tissulaires [253, 254]. En effet, plus il y a de cellules apoptotiques, plus il y a de cellules à remplacer et de tissu à régénérer. L'apoptose des cellules pulmonaires cause des bris de la barrière épithéliale pulmonaire ainsi que la destruction des cellules alvéolaires, entraînant une perte des échanges gazeux, en plus de contribuer à attirer les cellules de l'immunité innée, aggravant encore plus les dommages tissulaires. La migration des cellules épithéliales est essentielle pour la régénération des tissus pulmonaires afin de rétablir l'homéostasie après l'infection [255]. En effet, la régénération de l'épithélium pulmonaire se fait en trois étapes et deux d'entre elles reposent sur la migration des cellules épithéliales. D'abord, les cellules épithéliales voisines se propagent et migrent pour recouvrir la zone dénudée. Ensuite, les nouvelles cellules se propagent et migrent à leur tour pour restaurer l'épithélium. Finalement, les nouvelles cellules épithéliales se différencient en types cellulaires définis afin de reconstituer la barrière épithéliale et les fonctions respiratoires [256]. Les protéines régulant la migration cellulaire et l'apoptose en contexte d'infection virale représentent donc des cibles thérapeutiques prometteuses pour la résolution des infections virales. L'apoptose et la migration cellulaire ont un effet sur la propagation des virus. Effectivement, l'apoptose empêche la complétion du cycle de réplication des virus tels SeV et diminue le nombre de cellules infectées, limitant l'infection des cellules environnantes [257]. D'un autre côté, il a récemment été montré que la migration cellulaire favorise la propagation de RSV. En effet, l'infection par RSV augmente la migration des cellules et les cellules infectées se déplacent et favorisent l'infection des cellules non infectées [258]. On peut toutefois exclure l'implication de DUSP1 dans la régulation de la propagation de SeV ou RSV

via la régulation de l'apoptose et de la migration cellulaire. En effet, nos résultats montrent que l'expression ectopique ou l'inhibition de DUSP1 n'a aucun effet sur la réplication de SeV et de RSV (Robitaille *et al.* Figures 2D et 2E). Par contre, nous montrons que DUSP1 induit l'apoptose et bloque la migration cellulaire. Nos résultats suggèrent donc que DUSP1 joue un rôle dans l'induction des dommages tissulaires et l'inhibition de la réparation épithéliale, faisant de lui un acteur important dans la pathogenèse des virus respiratoires. Afin de confirmer cette hypothèse, nous pourrions effectuer une expérience de plaie en présence et en absence de DUSP1 pendant l'infection RSV, ce qui aiderait à prouver l'implication de DUSP1 dans les mécanismes de réparation tissulaires. En effet, cette expérience permet de mesurer la vitesse de réparation de l'épithélium [259]. Nos résultats concordent avec les données d'une étude sur les carcinomes hépatocellulaires (HCC). En effet, Xiao *et al.* ont montré que le microARN miR-324 est surexprimé dans les HCC. Ils ont démontré que miR-324 se lie à DUSP1 pour l'inhiber. L'inhibition de DUSP1 par miR-324 engendre l'inhibition de l'apoptose et l'augmentation de la migration des cellules SK-HEP-1 et HepG2, tout comme dans notre modèle. L'inhibition de miR-324 corrèle d'ailleurs avec une augmentation de p53 et une diminution de MAP2K1 et d'Akt, signifiant qu'ils sont sans doute impliqués dans la modulation de l'apoptose qui est observée [260]. Il serait donc pertinent de vérifier si, pendant l'infection par SeV et RSV, DUSP1 régule positivement p53 et négativement MAP2K1 et Akt.

Compte tenu de son importance, certaines études ont commencé à se pencher sur l'inhibition directe de DUSP1 comme cible thérapeutique potentielle dans le développement de nouveaux médicaments anti-inflammatoires et anticancéreux [210, 237, 261]. L'inhibition de DUSP1 fait d'ailleurs l'objet de plusieurs brevets dans le domaine de la thérapie contre le cancer [262-264]. Toutefois, les molécules inhibitrices de DUSP1 ne sont pas spécifiques, c'est pourquoi nous avons décidé de les exclure de notre étude. En effet, l'inhibiteur (*E*)-2-Benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (BCI) inhibe non seulement l'activité catalytique de DUSP1, mais aussi de DUSP6 [265]. Ro-31-8220 inhibe aussi DUSP1, mais est mieux connu comme inhibiteur de la protéine kinase C, la CaM kinase II, la protéine kinase A, la sirtuine et la « Glycogen Synthase Kinase 3 » (GSK-3) [224, 266-269]. La triptolide (PG490), qui est un immunosuppressant et un agent anti-inflammatoire, est un inhibiteur de NF- $\kappa$ B, en plus de DUSP1 [209, 270-272]. La sanguinarine inhibe DUSP1, mais

aussi « Signal Transducer and Activator of Transcription 3 » (STAT3), MMP-2 et MMP-9 [261, 273-275]. La chelerythrine inhibe DUSP1 et la protéine kinase C [261, 276, 277]. Finalement, NU-126 est un inhibiteur de DUSP1, mais aussi de « Vaccinia H1-Related Phosphatase » (VHR) [278]. En utilisant un de ces inhibiteurs, nous ne saurions pas si le phénotype observé provenait de l'inhibition de DUSP1 ou d'une autre protéine ciblée par l'inhibiteur. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser des ARN interférents pour inhiber l'expression de DUSP1. Par contre, la technologie des ARN interférents possède ses limitations. Principalement, la transfection d'ARN interférents peut engendrer des effets non-spécifiques. Effectivement, un grand nombre d'ARNdb introduit dans la cellule peut mener à l'activation de voies de signalisation de l'immunité innée, incluant la voie des ISG [279]. Par ailleurs, il se peut que l'ARN interférent inhibe une cible autre que celle escomptée en raison d'homologie de séquences. De plus, il est possible que les ARN interférents interfèrent avec la régulation de gènes dépendants de microARN endogènes, puisqu'ils utilisent la même machinerie cellulaire. Une combinaison de deux ARN interférents différents a été utilisée dans cette étude afin de maximiser l'inhibition de DUSP1 tout en minimisant les effets aléatoires de chacun des ARN interférents. De plus, l'utilisation de siCtrl prévient l'apparition de fausses conclusions basées sur les effets non-spécifiques qu'entraîne la présence d'ARN interférents dans la cellule. Contrairement à l'expression ectopique, l'utilisation d'ARN interférents a cependant l'avantage de jouer sur les protéines endogènes. La recherche d'un inhibiteur spécifique à DUSP1 est donc encore pertinente. Cibler DUSP1 spécifiquement pourrait s'avérer plus avantageux que cibler JNK/p38 d'un point de vue thérapeutique. En effet, l'utilisation de plusieurs inhibiteurs de JNK/p38 en étude clinique a entraîné des problèmes hépatotoxiques, sans doute dus à leur large profil d'expression et de fonctions et à leur régulation complexe impliquant des boucles de rétroaction et de multiples liens avec d'autres voies de signalisation [237]. Toutefois, puisque cette étude suggère que DUSP1 cible une population spécifique de JNK et p38 durant l'infection par RSV et SeV, la modulation de l'expression de DUSP1 à des fins thérapeutiques pourrait s'avérer très bénéfique. En effet, le fait de cibler une population spécifique de JNK/p38 permettrait de moduler une fonction particulière, sans toutefois affecter toutes les fonctions de JNK/p38 comme le font les inhibiteurs commerciaux, ce qui réduit considérablement le risque d'effets secondaires indésirables. Selon nos résultats, inhiber l'activité de DUSP1 pourrait être une stratégie

prometteuse pour réduire spécifiquement l'apoptose induite par les virus et promouvoir la migration cellulaire, ce qui améliorerait l'homéostasie des tissus pendant l'infection par des virus pathogènes tels que RSV.

## Conclusion

Au début de cette étude, notre hypothèse était que la phosphatase DUSP1 joue un rôle dans la régulation de la défense de l'hôte contre RSV et SeV via la voie de signalisation dépendante de JNK et p38. Nos objectifs spécifiques étaient de confirmer si DUSP1 inhibe l'activation de JNK et p38 pendant l'infection par RSV et SeV, de déterminer l'impact de DUSP1 dans les réponses pro-inflammatoire et antivirale dépendantes de JNK et p38 lors de l'infection par RSV et SeV et de déterminer si DUSP1 régule les mécanismes de dommages/réparations tissulaires pendant l'infection par RSV et SeV. Nous avons confirmé le rôle de DUSP1 dans la régulation négative de JNK et p38 pendant l'infection par RSV et SeV. De manière intéressante, nos données suggèrent que l'interaction entre JIP1 et JNK empêche DUSP1 de réguler le facteur de transcription AP-1 pendant l'infection par RSV et SeV. Nous proposons que DUSP1 inhibe l'activation d'une population spécifique des MAPK JNK/p38 n'étant pas impliquée dans l'activation d'AP-1 et la production subséquente de cytokines. À la suite de notre étude, nous pouvons conclure que oui, DUSP1 contribue à la régulation négative des défenses de l'hôte pendant l'infection par RSV et SeV. En effet, ces deux virus induisent l'expression de DUSP1, qui inhibe potentiellement les mécanismes de réparation des tissus via l'augmentation de l'apoptose et l'inhibition de la migration cellulaire. L'induction de DUSP1 par RSV et SeV pourrait donc être une stratégie pour favoriser leur pathogénèse. Ces données permettent non seulement d'acquérir de nouvelles connaissances permettant de mieux comprendre la pathogénèse associée aux virus respiratoires, mais également d'identifier DUSP1 comme une cible thérapeutique potentielle pour limiter les dommages tissulaires. À notre connaissance, il s'agit du premier rapport démontrant l'implication de DUSP1 dans les défenses de l'hôte contre l'infection par des virus respiratoires.

Il reste encore beaucoup de chemin à faire dans le domaine des infections virales, notamment par RSV. RSV est connu comme étant l'une des causes les plus fréquentes de maladie chez les enfants. Depuis sa découverte en 1956 [280], nous en savons un peu plus sur le cycle de vie de RSV et son interaction avec l'hôte [281], mais il y a encore beaucoup d'éléments que nous ne connaissons pas sur ce pathogène important. Malgré une soixantaine d'années de recherche, aucun vaccin ou traitement contre RSV n'est disponible à ce jour. Une

compréhension plus approfondie de la pathogenèse de RSV serait bénéfique non seulement pour combattre les infections à RSV, mais aussi pour contrer d'autres infections de virus respiratoires pathogènes, ainsi que pour le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes chroniques. Ce projet permet d'approfondir nos connaissances sur la modulation de la réponse de l'hôte dans le contexte de l'infection par des virus respiratoires tels que le virus pathogène RSV. Avec cette étude, nous apportons un peu de lumière à ce tableau qui reste encore sombre à nos yeux, afin qu'un jour, avec l'effort de tous, nous puissions voir le tableau en entier.



## Bibliographie

1. WHO. *Fact sheet N°310 : The top 10 causes of death*. 2017 January 2017 [2017-05-25]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
2. Baccala, R., et al., *TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity*. *Nat Med*, 2007. **13**(5): p. 543-51.
3. Ospelt, C. and S. Gay, *TLRs and chronic inflammation*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(4): p. 495-505.
4. Kato, H. and T. Fujita, *RIG-I-like receptors and autoimmune diseases*. *Curr Opin Immunol*, 2015. **37**: p. 40-5.
5. Quicke, K.M., M.S. Diamond, and M.S. Suthar, *Negative regulators of the RIG-I-like receptor signaling pathway*. *Eur J Immunol*, 2017. **47**(4): p. 615-628.
6. Flint, J., et al., *Principles of Virology, Fourth Edition, Bundle*. 2015: American Society of Microbiology.
7. Afonso, C.L., et al., *Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016*. *Arch Virol*, 2016. **161**(8): p. 2351-60.
8. Rima, B., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae*. *J Gen Virol*, 2017.
9. King, A.M.Q., et al., *Family - Paramyxoviridae*, in *Virus Taxonomy*. 2012, Elsevier: San Diego. p. 672-685.
10. Aliyu, A.M., et al., *Biology of human respiratory syncytial virus: a review*. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 2010. **3**(1): p. 147-155.
11. Mackie, P.L., *The classification of viruses infecting the respiratory tract*. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2003. **4**(2): p. 84-90.
12. Russell, C.J. and J.L. Hurwitz, *Sendai virus as a backbone for vaccines against RSV and other human paramyxoviruses*. *Expert Rev Vaccines*, 2016. **15**(2): p. 189-200.
13. WHO. *Fact sheet N°331 : Pneumonia*. 2016 September 2016 [cited 2017 2017-05-26]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>.
14. P. Cane, J.A.M., G. Taylor, J. Hull, S. P. Brearey, R. L. Smyth, Y. Murata, A. R. Falsey, D. J. Nokes, P. L. Collins, B. R. Murphy, K. L. Powell, D. Alber, A. J. Easton, J. B. Domachowske, H. F. Rosenberg, *Respiratory Syncytial Virus*. *Perspectives in medical virology*, ed. I.K.M. A. J. Zuckermann. Vol. 14. 2007: Elsevier. 340.

15. Hall, C.B., *Respiratory Syncytial Virus*. 1998, Philadelphia: lippincott Wlliams and Wilkins.
16. Wu, P. and T.V. Hartert, *Evidence for a causal relationship between respiratory syncytial virus infection and asthma*. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2011. **9**(9): p. 731-745.
17. Marja Ruotsalainen, E.P.-S., Mari K. Hyvärinen, Matti Korppi, *Respiratory Morbidity in Adulthood after Respiratory Syncytial Virus Hospitalization in Infancy*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2010. **29**(9): p. 872-874.
18. Sigurs, N., et al., *Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life*. *Thorax*, 2010. **65**(12): p. 1045-1052.
19. Stein, R.T., et al., *Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years*. *The Lancet*, 1999. **354**(9178): p. 541-545.
20. Sikkil, M.B., et al., *Respiratory Syncytial Virus Persistence in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2008. **27**(10): p. S63-S70 10.1097/INF.0b013e3181684d67.
21. Sheeran, P., et al., *Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease*. *Pediatr Infect Dis J*, 1999. **18**(2): p. 115-22.
22. McNamara, P.S., et al., *Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis*. *J Infect Dis*, 2005. **191**(8): p. 1225-32.
23. Mejias, A., M.W. Hall, and O. Ramilo, *Immune monitoring of children with respiratory syncytial virus infection*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2013. **9**(5): p. 393-5.
24. Kim, H.W., et al., *Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine*. *Am J Epidemiol*, 1969. **89**(4): p. 422-34.
25. Karron, R.A., et al., *Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants, and children*. *J Infect Dis*, 1997. **176**(6): p. 1428-36.
26. Wright, P.F., et al., *Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy*. *J Infect Dis*, 2000. **182**(5): p. 1331-42.

27. Wright, P.F., et al., *The interferon antagonist NS2 protein of respiratory syncytial virus is an important virulence determinant for humans*. J Infect Dis, 2006. **193**(4): p. 573-81.
28. Mejías, A. and O. Ramilo, *Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants*. Biologics : Targets & Therapy, 2008. **2**(3): p. 433-439.
29. Robinson, J.L., et al., *Preventing hospitalizations for respiratory syncytial virus infection*. Paediatrics & Child Health, 2015. **20**(6): p. 321-326.
30. McLellan, J.S., W.C. Ray, and M.E. Peeples, *Structure and Function of RSV Surface Glycoproteins*. Current topics in microbiology and immunology, 2013. **372**: p. 83-104.
31. Tayyari, F., et al., *Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1132-5.
32. San-Juan-Vergara, H., et al., *Cholesterol-rich microdomains as docking platforms for respiratory syncytial virus in normal human bronchial epithelial cells*. J Virol, 2012. **86**(3): p. 1832-43.
33. Krzyzaniak, M.A., et al., *Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein*. PLoS Pathog, 2013. **9**(4): p. e1003309.
34. Noton, S.L., et al., *The respiratory syncytial virus polymerase has multiple RNA synthesis activities at the promoter*. PLoS Pathog, 2012. **8**(10): p. e1002980.
35. Brock, S.C., et al., *The transmembrane domain of the respiratory syncytial virus F protein is an orientation-independent apical plasma membrane sorting sequence*. J Virol, 2005. **79**(19): p. 12528-35.
36. Noton, S.L. and R. Fearn, *Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication*. Virology, 2015. **479-480**: p. 545-54.
37. Shahriari, S., J. Gordon, and R. Ghildyal, *Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding*. Virol J, 2016. **13**(1): p. 161.
38. Kahn, J.S., et al., *Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion*. Virology, 1999. **254**(1): p. 81-91.

39. Gurtler, C. and A.G. Bowie, *Innate immune detection of microbial nucleic acids*. Trends Microbiol, 2013. **21**(8): p. 413-20.
40. Dixit, E. and J.C. Kagan, *Intracellular Pathogen Detection by RIG-I-Like Receptors*. Adv Immunol, 2013. **117**: p. 99-125.
41. Yoneyama, M., et al., *Viral RNA detection by RIG-I-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2015. **32**: p. 48-53.
42. Liu, S.Y., D.J. Sanchez, and G. Cheng, *New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(1): p. 57-64.
43. Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 513-45.
44. Li, M.M., M.R. MacDonald, and C.M. Rice, *To translate, or not to translate: viral and host mRNA regulation by interferon-stimulated genes*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(6): p. 320-9.
45. Torres-Pedraza, S., J.G. Betancur, and S. Urcuqui-Inchima, *Viral recognition by the innate immune system: the role of pattern recognition receptors*. 2011. Vol. 41. 2011.
46. Thompson, M.R., et al., *Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection*. Viruses, 2011. **3**(6): p. 920-40.
47. Marr, N., S.E. Turvey, and N. Grandvaux, *Pathogen recognition receptor crosstalk in respiratory syncytial virus sensing: a host and cell type perspective*. Trends Microbiol, 2013. **21**(11): p. 568-74.
48. Grandvaux, N., et al., *Sustained Activation of Interferon Regulatory Factor 3 during Infection by Paramyxoviruses Requires MDA5*. J Innate Immun, 2014. **6**(5): p. 650-662.
49. Kurt-Jones, E.A., et al., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediates response to respiratory syncytial virus*. Nature Immunol., 2000. **1**: p. 398-401.
50. Wang, T., et al., *Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1366-73.
51. Lee, H.K., et al., *Autophagy-Dependent Viral Recognition by Plasmacytoid Dendritic Cells*. Science, 2007. **315**(5817): p. 1398-1401.

52. Morris, S., et al., *Autophagy-mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses*. J Immunol, 2011. **187**(8): p. 3953-61.
53. Lund, J.M., et al., *Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5598-603.
54. Sabbah, A., et al., *Activation of innate immune antiviral responses by Nod2*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1073-80.
55. Loo, Y.M., et al., *Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 335-45.
56. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
57. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
58. Yount, J.S., et al., *MDA5 participates in the detection of paramyxovirus infection and is essential for the early activation of dendritic cells in response to Sendai Virus defective interfering particles*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4910-8.
59. Gitlin, L., et al., *Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) is involved in the innate immune response to Paramyxoviridae infection in vivo*. PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000734.
60. Kanneganti, T.D., et al., *Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 36560-8.
61. Martinon, F. and J. Tschopp, *Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases*. Cell, 2004. **117**(5): p. 561-74.
62. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
63. Baum, A. and A. Garcia-Sastre, *Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates*. Amino Acids, 2010. **38**(5): p. 1283-99.
64. Schmidt, A., et al., *5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 12067-72.

65. Pichlmair, A., et al., *Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10761-9.
66. Loo, Y.M. and M. Gale, Jr., *Immune Signaling by RIG-I-like Receptors*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 680-92.
67. Saha, S.K., et al., *Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif*, in *EMBO J*. 2006. p. 3257-63.
68. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*, in *Cell*. 2005. p. 669-82.
69. Xu, L.-G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*, in *Mol Cell*. 2005. p. 727-40.
70. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 981-8.
71. Dixit, E., et al., *Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity*. Cell, 2010. **141**(4): p. 668-81.
72. Horner, S.M., et al., *Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(35): p. 14590-14595.
73. Bender, S., et al., *Activation of Type I and III Interferon Response by Mitochondrial and Peroxisomal MAVS and Inhibition by Hepatitis C Virus*. PLOS Pathogens, 2015. **11**(11): p. e1005264.
74. Hou, F., et al., *MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response*. Cell, 2011. **146**(3): p. 448-61.
75. Jacobs, J.L. and C.B. Coyne, *Mechanisms of MAVS Regulation at the Mitochondrial Membrane*. Journal of Molecular Biology, 2013. **425**(24): p. 5009-5019.
76. Servant, M.J., N. Grandvaux, and J. Hiscott, *Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 985-992.
77. Taylor, K.E. and K.L. Mossman, *Recent advances in understanding viral evasion of type I interferon*. Immunology, 2013. **138**(3): p. 190-7.

78. McWhirter, S.M., B.R. Tenover, and T. Maniatis, *Connecting mitochondria and innate immunity*. Cell, 2005. **122**(5): p. 645-7.
79. Grandvaux, N., et al., *The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion*. Curr Opin Infect Dis, 2002. **15**(3): p. 259-67.
80. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1148-51.
81. Fujii, K., et al., *Systematic characterization by mass spectrometric analysis of phosphorylation sites in IRF-3 regulatory domain activated by IKK-i*. J Proteomics, 2010. **73**(6): p. 1196-203.
82. Mori, M., et al., *Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9698-702.
83. Fitzgerald, K.A., et al., *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 491-6.
84. Suhara, W., et al., *Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300*. J Biochem, 2000. **128**(2): p. 301-7.
85. Panne, D., et al., *Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22816-22.
86. 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, 2008. **82**(8): p. 3984-96.
87. Lin, R., et al., *Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2986-96.
88. 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, 2003. **278**(11): p. 9441-7.
89. 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, 1998. **17**(4): p. 1087-1095.

90. Kumar, K.P., et al., *Regulated nuclear-cytoplasmic localization of Interferon regulatory Factor 3, a subunit of Double-stranded RNA-Activated Factor 1*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. **20**: p. 4159-4168.
91. 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*, 2006. **177**(8): p. 5059-67.
92. Lu, L.L., et al., *Select Paramyxoviral V Proteins Inhibit IRF3 Activation by Acting as Alternative Substrates for Inhibitor of  $\kappa$ B Kinase  $\epsilon$  (IKKe)/TBK1*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(21): p. 14269-14276.
93. Grandvaux, N., et al., *Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes*. *J Virol*, 2002. **76**(11): p. 5532-9.
94. Perwitasari, O., et al., *Inhibitor of kappaB kinase epsilon (IKK(epsilon)), STAT1, and IFIT2 proteins define novel innate immune effector pathway against West Nile virus infection*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(52): p. 44412-23.
95. Dejardin, E., *The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(9): p. 1161-79.
96. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. *Cell*, 2008. **132**(3): p. 344-62.
97. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions*. *Genes Dev*, 2012. **26**(3): p. 203-34.
98. Grandvaux, N., *NF-kappaB redox regulation*, in *Principles of Free radicals Biomedicine*, K.a.S. Pantopoulos, H, Editor. 2011, Nova Science Publishers Inc.
99. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. *Cell*, 2002. **109** **Suppl**: p. S81-96.
100. Zarnegar, B.J., et al., *Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(12): p. 1371-8.
101. Sun, S.C., *The noncanonical NF-kappaB pathway*. *Immunol Rev*, 2012. **246**(1): p. 125-40.



102. Ford, E. and D. Thanos, *The transcriptional code of human IFN-beta gene expression*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(3-4): p. 328-36.
103. Zhang, S., et al., *The c-Jun N-terminal kinase (JNK) is involved in H5N1 influenza A virus RNA and protein synthesis*. Arch Virol, 2016. **161**(2): p. 345-51.
104. Khorasanizadeh, M., et al., *Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma*. Pharmacology & Therapeutics, 2017. **174**(Supplement C): p. 112-126.
105. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011. **75**(1): p. 50-83.
106. Wang, J. and G. Tai, *Role of C-Jun N-terminal Kinase in Hepatocellular Carcinoma Development*. Target Oncol, 2016. **11**(6): p. 723-738.
107. Bode, A.M. and Z. Dong, *The Functional Contrariety of JNK*. Molecular carcinogenesis, 2007. **46**(8): p. 591-598.
108. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. Biochem J, 2010. **429**(3): p. 403-17.
109. Kappelmann, M., A. Bosserhoff, and S. Kuphal, *AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma*. Eur J Cell Biol, 2014. **93**(1-2): p. 76-81.
110. Adamson, A.L., et al., *Epstein-Barr Virus Immediate-Early Proteins BZLF1 and BRLF1 Activate the ATF2 Transcription Factor by Increasing the Levels of Phosphorylated p38 and c-Jun N-Terminal Kinases*. Journal of Virology, 2000. **74**(3): p. 1224-1233.
111. Mogensen, T.H. and S.R. Paludan, *Molecular pathways in virus-induced cytokine production*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(1): p. 131-50.
112. Sreekanth, G.P., et al., *SB203580 Modulates p38 MAPK Signaling and Dengue Virus-Induced Liver Injury by Reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 Phosphorylation*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0149486.
113. Marchant, D., et al., *Toll-Like Receptor 4-Mediated Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is a Determinant of Respiratory Virus Entry and Tropism*. Journal of Virology, 2010. **84**(21): p. 11359-11373.

114. Ludwig, S., et al., *Influenza Virus-induced AP-1-dependent Gene Expression Requires Activation of the JNK Signaling Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(14): p. 10990-10998.
115. Mikkelsen, S.S., et al., *RIG-I-mediated activation of p38 MAPK is essential for viral induction of interferon and activation of dendritic cells: dependence on TRAF2 and TAK1*, in *J Biol Chem*. 2009. p. 10774-82.
116. Yoshizawa, T., et al., *Synoviocyte Innate Immune Responses: I. Differential Regulation of Interferon Responses and the JNK Pathway by MAPK Kinases*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2008. **181**(5): p. 3252-3258.
117. Pereira, A.C.T.C., et al., *A Vaccinia Virus-Driven Interplay between the MKK4/7-JNK1/2 Pathway and Cytoskeleton Reorganization*. Journal of Virology, 2012. **86**(1): p. 172-184.
118. Huang, Y., et al., *MAVS-MKK7-JNK2 Defines a Novel Apoptotic Signaling Pathway during Viral Infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(3): p. e1004020.
119. Johnson, R.A., S.-M. Huong, and E.-S. Huang, *Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase p38 by Human Cytomegalovirus Infection through Two Distinct Pathways: a Novel Mechanism for Activation of p38*. Journal of Virology, 2000. **74**(3): p. 1158-1167.
120. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 807-69.
121. Maruoka, S., et al., *ASK1 regulates influenza virus infection-induced apoptotic cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(4): p. 870-6.
122. Dey, N., et al., *TAK1 regulates NF-KappaB and AP-1 activation in airway epithelial cells following RSV infection*. Virology, 2011. **418**(2): p. 93-101.
123. Okazaki, T., et al., *The ASK family kinases differentially mediate induction of type I interferon and apoptosis during the antiviral response*. Sci Signal, 2015. **8**(388): p. ra78.
124. Yoshida, R., et al., *TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36211-20.

125. Labuda, T., et al., *MEK kinase 1 is a negative regulator of virus-specific CD8(+) T cells*. Eur J Immunol, 2006. **36**(8): p. 2076-84.
126. Desmet, E.A., et al., *Mixed Lineage Kinase 3 deficiency delays viral clearance in the lung and is associated with diminished influenza-induced cytopathic effect in infected cells*. Virology, 2010. **400**(2): p. 224-32.
127. Bogoyevitch, M.A., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2010. **1804**(3): p. 463-475.
128. Börgeling, Y., et al., *Inhibition of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Impairs Influenza Virus-induced Primary and Secondary Host Gene Responses and Protects Mice from Lethal H5N1 Infection*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(1): p. 13-27.
129. Kujime, K., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3222-8.
130. Lee, D.C., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10147-54.
131. Prabhala, P., et al., *Temporal regulation of cytokine mRNA expression by tristetraprolin: dynamic control by p38 MAPK and MKP-1*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **308**(9): p. L973-80.
132. Tomida, T., M. Takekawa, and H. Saito, *Oscillation of p38 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8350.
133. Chi, H., et al., *Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2274-9.
134. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. The Journal of Immunology, 1991. **147**(11): p. 3815-22.
135. Zhu, L., et al., *The activation of p38MAPK and JNK pathways in bovine herpesvirus 1 infected MDBK cells*. Veterinary Research, 2016. **47**(1): p. 91.

136. Arbour, N., et al., *c-Jun NH(2)-Terminal Kinase (JNK)1 and JNK2 Signaling Pathways Have Divergent Roles in CD8(+) T Cell-mediated Antiviral Immunity*. The Journal of Experimental Medicine, 2002. **195**(7): p. 801-810.
137. Liu, J. and A. Lin, *Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword*. Cell Res, 2005. **15**(1): p. 36-42.
138. Ventura, J.J., et al., *Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK*. Mol Cell, 2006. **21**(5): p. 701-10.
139. Gillis, P.A., L.H. Okagaki, and S.A. Rice, *Herpes Simplex Virus Type 1 ICP27 Induces p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Apoptosis in HeLa Cells*. Journal of Virology, 2009. **83**(4): p. 1767-1777.
140. Shiizaki, S., I. Naguro, and H. Ichijo, *Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling*. Advances in Biological Regulation, 2013. **53**(1): p. 135-144.
141. Zhang, H., et al., *Activation of PI3K/Akt pathway limits JNK-mediated apoptosis during EV71 infection*. Virus Research, 2014. **192**: p. 74-84.
142. Thornton, T.M. and M. Rincon, *Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival*. International Journal of Biological Sciences, 2009. **5**(1): p. 44-52.
143. Zhang, Q., et al., *IPS-1 plays a dual function to directly induce apoptosis in murine melanoma cells by inactivated Sendai virus*. Int J Cancer, 2014. **134**(1): p. 224-34.
144. Gao, H., et al., *Induction of apoptosis in hormone-resistant human prostate cancer PC3 cells by inactivated Sendai virus*. Biomed Environ Sci, 2014. **27**(7): p. 506-14.
145. Huang, C., K. Jacobson, and M.D. Schaller, *MAP kinases and cell migration*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 20): p. 4619-28.
146. Jaeschke, A., et al., *JNK2 Is a Positive Regulator of the cJun Transcription Factor*. Molecular Cell, 2006. **23**(6): p. 899-911.
147. Lin, C.C., et al., *IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression*. Cell Signal, 2009. **21**(11): p. 1652-62.

148. Arnold, R. and W. König, *Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Lung Endothelial Cells Enhances Selectively Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(11): p. 7359-7367.
149. Singh, D., K.L. McCann, and F. Imani, *MAPK and heat shock protein 27 activation are associated with respiratory syncytial virus induction of human bronchial epithelial monolayer disruption*. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 2007. **293**(2): p. L436-L445.
150. Sun, Y., et al., *Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis*. J Recept Signal Transduct Res, 2015. **35**(6): p. 600-4.
151. Sabapathy, K., et al., *Distinct Roles for JNK1 and JNK2 in Regulating JNK Activity and c-Jun-Dependent Cell Proliferation*. Molecular Cell, 2004. **15**(5): p. 713-725.
152. Shaw, A.S. and E.L. Filbert, *Scaffold proteins and immune-cell signalling*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(1): p. 47-56.
153. Dhanasekaran, D.N., et al., *Scaffold proteins of MAP-kinase modules*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3185-3202.
154. Dickens, M., et al., *A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway*. Science, 1997. **277**(5326): p. 693-6.
155. Whitmarsh, A.J., et al., *A Mammalian Scaffold Complex That Selectively Mediates MAP Kinase Activation*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1671-1674.
156. Nihalani, D., et al., *Mixed lineage kinase-dependent JNK activation is governed by interactions of scaffold protein JIP with MAPK module components*. The EMBO Journal, 2001. **20**(13): p. 3447-3458.
157. Moon, J. and S.H. Park, *Reassembly of JIP1 scaffold complex in JNK MAP kinase pathway using heterologous protein interactions*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96797.
158. Whitmarsh, A.J., et al., *Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2421-32.
159. Kristensen, O., et al., *A unique set of SH3-SH3 interactions controls IBI homodimerization*. The EMBO Journal, 2006. **25**(4): p. 785-797.

160. Kukekov, N.V., Z. Xu, and L.A. Greene, *Direct Interaction of the Molecular Scaffolds POSH and JIP Is Required for Apoptotic Activation of JNKs*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(22): p. 15517-15524.
161. Xu, Z., N.V. Kukekov, and L.A. Greene, *POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis*. Embo j, 2003. **22**(2): p. 252-61.
162. Stebbins, J.L., et al., *Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16809-13.
163. Bonny, C., et al., *Cell-Permeable Peptide Inhibitors of JNK*. Novel Blockers of  $\beta$ -Cell Death, 2001. **50**(1): p. 77-82.
164. Barr, R.K., T.S. Kendrick, and M.A. Bogoyevitch, *Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 10987-97.
165. Borsello, T., et al., *A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1180-6.
166. Melino, M., et al., *The effect of the JNK inhibitor, JIP peptide, on human T lymphocyte proliferation and cytokine production*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7300-6.
167. Blanco, S., et al., *Modulation of interleukin-1 transcriptional response by the interaction between VRK2 and the JIP1 scaffold protein*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1660.
168. Yasuda, J., et al., *The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7245-54.
169. Schoorlemmer, J. and M. Goldfarb, *Fibroblast Growth Factor Homologous Factors Are Intracellular Signalling Proteins*. Current biology : CB, 2001. **11**(10): p. 793-797.
170. Buchsbaum, R.J., B.A. Connolly, and L.A. Feig, *Interaction of Rac Exchange Factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a Scaffold for the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade*. Molecular and Cellular Biology, 2002. **22**(12): p. 4073-4085.
171. Robidoux, J., et al., *Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(13): p. 5466-79.
172. Matsuguchi, T., et al., *JNK-interacting protein 3 associates with Toll-like receptor 4 and is involved in LPS-mediated JNK activation*. The EMBO Journal, 2003. **22**(17): p. 4455-4464.

173. Kelkar, N., et al., *Morphogenesis of the telencephalic commissure requires scaffold protein JNK-interacting protein 3 (JIP3)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9843-8.
174. Desai, L.P., S.R. White, and C.M. Waters, *Mechanical stretch decreases FAK phosphorylation and reduces cell migration through loss of JIP3-induced JNK phosphorylation in airway epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(3): p. L520-9.
175. Di, A., et al., *A novel function of sphingosine kinase 1 suppression of JNK activity in preventing inflammation and injury*. J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 15848-57.
176. Kelkar, N., et al., *Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(3): p. 1030-43.
177. Ito, M., et al., *JSAP1, a Novel Jun N-Terminal Protein Kinase (JNK)-Binding Protein That Functions as a Scaffold Factor in the JNK Signaling Pathway*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(11): p. 7539-7548.
178. Becker, E.B.E. and A. Bonni, *Pin1 Mediates Neural-Specific Activation of the Mitochondrial Apoptotic Machinery*. Neuron, 2006. **49**(5): p. 655-662.
179. Takino, T., et al., *JSAP1/JIP3 Cooperates with Focal Adhesion Kinase to Regulate c-Jun N-terminal Kinase and Cell Migration*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(45): p. 37772-37781.
180. Shankar, S., B. Mohapatra, and A. Suri, *Cloning of a novel human testis mRNA specifically expressed in testicular haploid germ cells, having unique palindromic sequences and encoding a leucine zipper dimerization motif*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(2): p. 561-5.
181. Yasuoka, H., et al., *A Novel Protein Highly Expressed in Testis Is Overexpressed in Systemic Sclerosis Fibroblasts and Targeted by Autoantibodies*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(12): p. 6883-6890.
182. Kelkar, N., C.L. Standen, and R.J. Davis, *Role of the JIP4 Scaffold Protein in the Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways*. Molecular and Cellular Biology, 2005. **25**(7): p. 2733-2743.

183. Lee, C.M., et al., *JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(22): p. 14189-14194.
184. Jagadish, N., et al., *Characterization of a novel human sperm-associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein*. Biochem J, 2005. **389**(Pt 1): p. 73-82.
185. Hu, J.-H., et al., *Feedback control of MKP-1 expression by p38*. Cellular Signalling, 2007. **19**(2): p. 393-400.
186. Ambrosino, C., et al., *Negative Feedback Regulation of MKK6 mRNA Stability by p38 $\alpha$  Mitogen-Activated Protein Kinase*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(1): p. 370-381.
187. Willoughby, E.A., et al., *The JNK-interacting Protein-1 Scaffold Protein Targets MAPK Phosphatase-7 to Dephosphorylate JNK*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(12): p. 10731-10736.
188. Kim, A.H., et al., *Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis*. Neuron, 2002. **35**(4): p. 697-709.
189. Zhang, B., et al., *The TAK1-JNK cascade is required for IRF3 function in the innate immune response*. Cell Res, 2009. **19**(4): p. 412-28.
190. Navarro, L. and M. David, *p38-dependent activation of interferon regulatory factor 3 by lipopolysaccharide*. J Biol Chem, 1999. **274**(50): p. 35535-8.
191. Chen, Y., et al., *p38 inhibition provides anti-DNA virus immunity by regulation of USP21 phosphorylation and STING activation*. The Journal of Experimental Medicine, 2017.
192. Schulze-Osthoff, K., et al., *Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades*. Immunobiology, 1997. **198**(1-3): p. 35-49.
193. Chiang, C. and M.U. Gack, *Post-translational Control of Intracellular Pathogen Sensing Pathways*. Trends Immunol, 2017. **38**(1): p. 39-52.
194. Eisenacher, K. and A. Krug, *Regulation of RLR-mediated innate immune signaling--it is all about keeping the balance*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(1): p. 36-47.
195. Oshiumi, H., M. Matsumoto, and T. Seya, *Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I*. J Biochem, 2012. **151**(1): p. 5-11.



196. Kayagaki, N., et al., *A Deubiquitinase That Regulates Type I Interferon Production*. Science, 2007. **318**(5856): p. 1628-1632.
197. Salojin, K. and T. Oravec, *Regulation of innate immunity by MAPK dual-specificity phosphatases: knockout models reveal new tricks of old genes*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(4): p. 860-9.
198. Lang, R., M. Hammer, and J. Mages, *DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7497-504.
199. Wies, E., et al., *Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PPI is essential for innate immune signaling*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 437-49.
200. Gu, M., et al., *Protein phosphatase PPI negatively regulates the Toll-like receptor- and RIG-I-like receptor-triggered production of type I interferon by inhibiting IRF3 phosphorylation at serines 396 and 385 in macrophage*. Cell Signal, 2014. **26**(12): p. 2930-9.
201. Zhao, Y., et al., *PPM1B negatively regulates antiviral response via dephosphorylating TBK1*. Cell Signal, 2012. **24**(11): p. 2197-204.
202. Long, L., et al., *Recruitment of phosphatase PP2A by RACK1 adaptor protein deactivates transcription factor IRF3 and limits type I interferon signaling*. Immunity, 2014. **40**(4): p. 515-29.
203. Peng, D., et al., *A Novel Function of F-Box Protein FBXO17 in Negative Regulation of Type I IFN Signaling by Recruiting PP2A for IFN Regulatory Factor 3 Deactivation*. J Immunol, 2017. **198**(2): p. 808-819.
204. James, Sharmy J., et al., *MAPK Phosphatase 5 Expression Induced by Influenza and Other RNA Virus Infection Negatively Regulates IRF3 Activation and Type I Interferon Response*. Cell Reports, 2015. **10**(10): p. 1722-1734.
205. Xiang, W., Q. Zhang, and X. Lin, *PPM1A silences cytosolic RNA sensing and antiviral defense through direct dephosphorylation of MAVS and TBK1*. Sci Adv, 2016. **2**(7): p. e1501889.

206. Davis, M.E., et al., *Antagonism of the phosphatase PPI by the measles virus V protein is required for innate immune escape of MDA5*. Cell Host Microbe, 2014. **16**(1): p. 19-30.
207. Bhore, N., et al., *Critical Roles of Dual-Specificity Phosphatases in Neuronal Proteostasis and Neurological Diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(9): p. 1963.
208. Franklin, C.C. and A.S. Kraft, *Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 16917-23.
209. Zhao, Q., et al., *The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8101-8.
210. Chen, P., et al., *Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6408-16.
211. Vicent, S., et al., *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(11): p. 3639-49.
212. Chattopadhyay, S., et al., *MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer*. Oncogene, 2006. **25**(23): p. 3335-45.
213. Wang, H.Y., Z. Cheng, and C.C. Malbon, *Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer*. Cancer Lett, 2003. **191**(2): p. 229-37.
214. Rauhala, H.E., et al., *Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer*. Int J Cancer, 2005. **117**(5): p. 738-45.
215. Gil-Araujo, B., et al., *Dual specificity phosphatase 1 expression inversely correlates with NF-kappaB activity and expression in prostate cancer and promotes apoptosis through a p38 MAPK dependent mechanism*. Mol Oncol, 2014. **8**(1): p. 27-38.

216. Xiao, j., et al., *MiR-429 Regulates Alveolar Macrophage Inflammatory Cytokine Production and is Involved in LPS-induced Acute Lung Injury*. *Biochemical Journal*, 2015.
217. Smallie, T., et al., *Dual-Specificity Phosphatase 1 and Tristetraprolin Cooperate To Regulate Macrophage Responses to Lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 2015. **195**(1): p. 277-88.
218. Golebski, K., et al., *EGR-1 and DUSP-1 are important negative regulators of pro-allergic responses in airway epithelium*. *Mol Immunol*, 2015. **65**(1): p. 43-50.
219. Abraham, S.M., et al., *Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1*. *J Exp Med*, 2006. **203**(8): p. 1883-9.
220. Wang, X., et al., *The role of MAP kinase phosphatase-1 in the protective mechanism of dexamethasone against endotoxemia*. *Life Sci*, 2008. **83**(19-20): p. 671-80.
221. Vandevyver, S., et al., *Glucocorticoid receptor dimerization induces MKP1 to protect against TNF-induced inflammation*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012. **122**(6): p. 2130-2140.
222. Lin, Y.W., S.M. Chuang, and J.L. Yang, *ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(24): p. 21534-41.
223. Brooks, S.A. and P.J. Blakeshear, *Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2013. **1829**(6-7): p. 666-679.
224. Liao, Y., et al., *Regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase and dual-specificity phosphatase 1 feedback loop modulates the induction of interleukin 6 and 8 in cells infected with coronavirus infectious bronchitis virus*. *Virology*, 2011. **420**(2): p. 106-16.
225. Cáceres, A., et al., *Involvement of the Cellular Phosphatase DUSP1 in Vaccinia Virus Infection*. *PLoS Pathogens*, 2013. **9**(11): p. e1003719.
226. Salojin, K.V., et al., *Essential Role of MAPK Phosphatase-1 in the Negative Control of Innate Immune Responses*. *The Journal of Immunology*, 2006. **176**(3): p. 1899-1907.
227. Wang, X. and Y. Liu, *Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1*. *Cellular Signalling*, 2007. **19**(7): p. 1372-1382.

228. Clark, A.R., *MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids?* J Endocrinol, 2003. **178**(1): p. 5-12.
229. Korhonen, R. and E. Moilanen, *Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 as an inflammatory factor and drug target.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2014. **114**(1): p. 24-36.
230. Zeke, A., et al., *JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships.* Microbiol Mol Biol Rev, 2016. **80**(3): p. 793-835.
231. Takaesu, G., et al., *Activation of p38alpha/beta MAPK in myogenesis via binding of the scaffold protein JLP to the cell surface protein Cdo.* J Cell Biol, 2006. **175**(3): p. 383-8.
232. Uhlik, M.T., et al., *Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(12): p. 1104-10.
233. Hilder, T.L., M.H. Malone, and G.L. Johnson, *Hyperosmotic induction of mitogen-activated protein kinase scaffolding.* Methods Enzymol, 2007. **428**: p. 297-312.
234. Pan, C.Q., et al., *Modularity and functional plasticity of scaffold proteins as p(l)acemakers in cell signaling.* Cellular Signalling, 2012. **24**(11): p. 2143-2165.
235. Caunt, C.J. and S.M. Keyse, *Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling.* FEBS J, 2013. **280**(2): p. 489-504.
236. Kondoh, K. and E. Nishida, *Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2007. **1773**(8): p. 1227-1237.
237. Jeffrey, K.L., et al., *Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses.* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 391-403.
238. Zehorai, E. and R. Seger, *Beta-like importins mediate the nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases.* Mol Cell Biol, 2014. **34**(2): p. 259-70.
239. Xu, S. and M.H. Cobb, *MEKK1 Binds Directly to the c-Jun N-terminal Kinases/Stress-activated Protein Kinases.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(51): p. 32056-32060.
240. Engstrom, W., A. Ward, and K. Moorwood, *The role of scaffold proteins in JNK signalling.* Cell Prolif, 2010. **43**(1): p. 56-66.

241. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
242. Matsumoto, M., et al., *Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(5): p. 1364-9.
243. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
244. Choi, J.E., et al., *Suppression of dual specificity phosphatase 1 expression inhibits hepatitis C virus replication*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119172.
245. Santos, C.R., et al., *Vaccinia virus B1R kinase interacts with JIP1 and modulates c-Jun-dependent signaling*. J Virol, 2006. **80**(15): p. 7667-75.
246. Tisoncik, J.R., et al., *Into the eye of the cytokine storm*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012. **76**(1): p. 16-32.
247. Schwarze, S.R., et al., *In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse*. Science, 1999. **285**(5433): p. 1569-72.
248. Lin, Y.C., et al., *DUSP1 expression induced by HDAC1 inhibition mediates gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancers*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(2): p. 428-38.
249. Cagnol, S. and J.C. Chambard, *ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence*. Febs j, 2010. **277**(1): p. 2-21.
250. Wei, B., et al., *Tom70 mediates Sendai virus-induced apoptosis on mitochondria*. J Virol, 2015. **89**(7): p. 3804-18.
251. Parsons, J.T., et al., *Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5606-13.
252. Zhao, X. and J.-L. Guan, *Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis*. Advanced drug delivery reviews, 2011. **63**(8): p. 610-615.
253. Barber, G.N., *Host defense, viruses and apoptosis*. Cell Death Differ, 2001. **8**(2): p. 113-26.
254. Allie, S.R. and T.D. Randall, *Pulmonary immunity to viruses*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(14): p. 1737-1762.

255. Girault, A. and E. Brochiero, *Evidence of K<sup>+</sup> channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. **306**(4): p. C307-19.
256. Yoo, J.-K., et al., *Viral infection of the lung: Host response and sequelae*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2013. **132**(6): p. 10.1016/j.jaci.2013.06.006.
257. Orzalli, M.H. and J.C. Kagan, *Apoptosis and Necroptosis as Host Defense Strategies to Prevent Viral Infection*. Trends Cell Biol, 2017.
258. Mehedi, M., P.L. Collins, and U.J. Buchholz, *A novel host factor for human respiratory syncytial virus*. Commun Integr Biol, 2017. **10**(3): p. e1319025.
259. Trinh, N.T., et al., *Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue*. Eur Respir J, 2012. **40**(6): p. 1390-400.
260. Xiao, W.L., et al., *Up-regulation of miR-324 suppresses cell apoptosis by targeting DUSP1 in hepatocellular carcinoma*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2017. **10**(2): p. 1243-1252.
261. Vogt, A., et al., *The benzo[c]phenanthridine alkaloid, sanguinarine, is a selective, cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 19078-86.
262. Azam, M. and M. Kesarwani, *Therapy for leukemia*. 2014, Google Patents.
263. Azam, M. and M. KESARWANI, *Therapy for solid tumors*. 2015, Google Patents.
264. Azam, M., *Therapeutic targeting of myeloproliferative neoplasms by dusp1 inhibition*. 2016, Google Patents.
265. Molina, G., et al., *Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(9): p. 680-7.
266. Beltman, J., F. McCormick, and S.J. Cook, *The selective protein kinase C inhibitor, Ro-31-8220, inhibits mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression, induces c-Jun expression, and activates Jun N-terminal kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 27018-24.
267. Davis, P.D., et al., *Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-Bisarylmaleimides*. J Med Chem, 1992. **35**(1): p. 177-84.
268. Trapp, J., et al., *Adenosine mimetics as inhibitors of NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases, from kinase to sirtuin inhibition*. J Med Chem, 2006. **49**(25): p. 7307-16.

269. Hers, I., J.M. Tavaré, and R.M. Denton, *The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity*. FEBS Lett, 1999. **460**(3): p. 433-6.
270. Lee, K.Y., et al., *PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor- $\alpha$  to induce apoptosis in tumor cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13451-5.
271. Qiu, D., et al., *Immunosuppressant PG490 (triptolide) inhibits T-cell interleukin-2 expression at the level of purine-box/nuclear factor of activated T-cells and NF- $\kappa$ B transcriptional activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13443-50.
272. Shepherd, E.G., et al., *The function of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in peptidoglycan-stimulated macrophages*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54023-31.
273. Sun, M., et al., *Inhibition of Stat3 activation by sanguinarine suppresses prostate cancer cell growth and invasion*. Prostate, 2012. **72**(1): p. 82-9.
274. Pedersen, J.M., et al., *Prediction and identification of drug interactions with the human ATP-binding cassette transporter multidrug-resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2)*. J Med Chem, 2008. **51**(11): p. 3275-87.
275. Park, S.Y., et al., *Sanguinarine inhibits invasiveness and the MMP-9 and COX-2 expression in TPA-induced breast cancer cells by inducing HO-1 expression*. Oncol Rep, 2014. **31**(1): p. 497-504.
276. Freerman, A.J., et al., *Role of c-jun in human myeloid leukemia cell apoptosis induced by pharmacological inhibitors of protein kinase C*. Mol Pharmacol, 1996. **49**(5): p. 788-95.
277. Eckly-Michel, A.E., A. Le Bec, and C. Lugnier, *Chelerythrine, a protein kinase C inhibitor, interacts with cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Eur J Pharmacol, 1997. **324**(1): p. 85-8.
278. Lazo, J.S., et al., *Novel benzofuran inhibitors of human mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*. Bioorg Med Chem, 2006. **14**(16): p. 5643-50.
279. Sledz, C.A. and B.R.G. Williams, *RNA interference in biology and disease*. Blood, 2005. **106**(3): p. 787-794.
280. Blount, R.E., Jr., J.A. Morris, and R.E. Savage, *Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza*. Proc Soc Exp Biol Med, 1956. **92**(3): p. 544-9.

281. Cervantes-Ortiz, S.L., N. Zamorano Cuervo, and N. Grandvaux, *Respiratory Syncytial Virus and Cellular Stress Responses: Impact on Replication and Physiopathology*. *Viruses*, 2016. **8**(5).



## **Annexe I - Autre publication scientifique**

### **A high resolution method to monitor phosphorylation-dependent activation of IRF3**

Article vidéo publié avec comité de lecture à *Journal of Visualized Experiments* :  
<https://www.jove.com/video/53723/>

#### **Auteurs : liste**

Alexa C. Robitaille, Mélissa K. Mariani, Audray Fortin et Nathalie Grandvaux.

#### **Contribution des auteurs**

Cet article présenté ci-dessous décrit une technique spécifique pour étudier l'activation d'IRF3 pour laquelle notre laboratoire est expert. Alexa Robitaille et Mélissa Mariani ont contribué de manière égale à la rédaction de l'article, sous la supervision de Dre Nathalie Grandvaux. Audray Fortin a révisé l'écriture et l'anglais.

## Video Article

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

Alexa C. Robitaille<sup>1,2,3</sup>, Mélissa K. Mariani<sup>1,3</sup>, Audray Fortin<sup>1</sup>, Nathalie Grandvaux<sup>1,2,3</sup><sup>1</sup>CRCHUM - Research center, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Université de Montréal<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal<sup>3</sup>Faculty of Medicine, Université de Montréal

\*These authors contributed equally

Correspondence to: Nathalie Grandvaux at [nathalie.grandvaux@umontreal.ca](mailto:nathalie.grandvaux@umontreal.ca)URL: <https://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  $\beta$  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 <https://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 $\beta$ , 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 IFIT1/2/3<sup>1-3</sup>. IRF3 activation has been reported following infection with numerous viruses, or exposure to polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) or lipopolysaccharide (LPS)<sup>4</sup>. Importantly, most studied viruses have evolved mechanisms to evade the IRF3-mediated response, and thereby escape the host innate immune defense<sup>5</sup>. 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 structure<sup>6-11</sup> 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<sup>6,12-14</sup>. Accumulation of this hypophosphorylated form of IRF3 is induced by stress inducers, growth factors and DNA-damaging agents<sup>6</sup>. 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 manner<sup>15-17</sup>. 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<sup>9,10,17-19</sup>. Phosphorylation of Thr390 is also thought to contribute to virus-induced IRF3 activation<sup>20</sup>. Mass spectrometry analyses of IRF3 have demonstrated that Ser386, Thr390, Ser396 and Ser402 residues are directly phosphorylated by the inhibitor of  $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ )/TANK-binding kinase 1 (TBK1) kinases<sup>9,10</sup>. Phosphorylation at the C-terminal residues is also required for termination of IRF3 activation through polyubiquitination and proteasome-mediated degradation<sup>10</sup>. This process is also dependent on the phosphorylation at Ser339, which is necessary for the recruitment of the propyl isomerase Pin1<sup>10,11</sup>. 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<sup>10,21</sup>. 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<sup>10,22</sup>.

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 status<sup>10</sup>. Unphosphorylated (form I), hypophosphorylated (form II) and hyperphosphorylated (forms III and IV) IRF3 forms<sup>6,18,23</sup> 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<sup>9,15,19,24,25</sup>.

### 1. Infection of A549 Cells

- Maintain A549 cells in culture in a 15 cm plate at 37 °C/5% CO<sub>2</sub> 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 10<sup>6</sup> cells per 60 mm plate in 4 ml of pre-heated complete F12K/Ham medium. Incubate for 20 - 24 hr at 37 °C/5% CO<sub>2</sub>. After 20 - 24 hr, the cells form a 90% confluent monolayer (this corresponds to 1.5 x 10<sup>6</sup> 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/10<sup>6</sup> cells. Do not add virus in the non-infected control plate.
- Incubate the cells in the incubator at 37 °C/5% CO<sub>2</sub>. 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% CO<sub>2</sub> 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 (ddH<sub>2</sub>O). 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.

6. 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.
7. Quantify proteins using any protein quantification procedure compatible with the lysis buffer such as Bradford-based protein assay<sup>26</sup>.

### 3. Resolution of WCE by High Resolution SDS-PAGE

1. Prepare three denaturing electrophoresis gels.
  1. 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 ddH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O.  
Caution! Acrylamide, TEMED and SDS are toxic and/or irritant. Wear protective gloves and manipulate under a fume hood.
  2. 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.
2. 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 ddH<sub>2</sub>O) 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.
3. 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 (dH<sub>2</sub>O).
4. 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.
5. 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.
6. Proceed to the transfer onto nitrocellulose membranes (step 5).

### 4. Analysis of IRF3 Dimerization by Native-PAGE

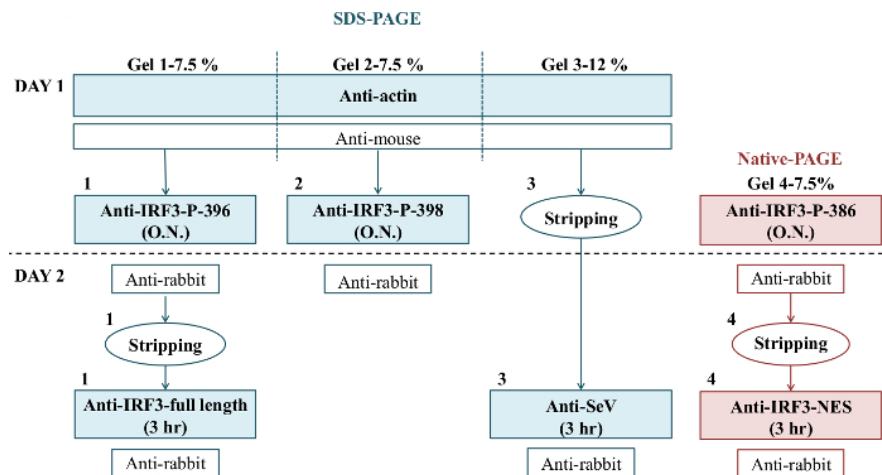
NOTE: This method was originally described by the group of Dr. T. Fujita<sup>27</sup>.

1. 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 ddH<sub>2</sub>O. The lower chamber buffer contains 25 mM Tris-HCl pH 8.4 (RT) and 192 mM glycine in ddH<sub>2</sub>O.  
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.
2. 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 ddH<sub>2</sub>O.
3. 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.
4. 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 ddH<sub>2</sub>O.
5. Load 8 - 10 μg WCE (prepared as described in step 4.4) immediately at the end of the pre-run.
6. 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

1. Prepare the transfer buffer containing 25 mM Tris-Base and 192 mM glycine in ddH<sub>2</sub>O. Refrigerate the transfer buffer at 4 °C before use.
2. 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.
3. Uncast the gels (SDS-PAGE and native-PAGE) and cut one corner of each gel for proper orientation.
  1. 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.
4. Incubate the gels (SDS-PAGE and native-PAGE) in the transfer buffer for 5 - 10 min.
5. 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.
6. 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.
7. 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 ddH<sub>2</sub>O. Wash the membranes 3x 5 min in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in dH<sub>2</sub>O).  
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.
8. For the native-PAGE membrane proceed directly to step 5.11.

9. Rinse the three SDS-PAGE membranes quickly in dH<sub>2</sub>O before incubating them for 1 min in red ponceau solution containing 6.57 mM red ponceau and 1% acetic acid in ddH<sub>2</sub>O.  
NOTE: The red ponceau solution can be reused several times.
10. Rinse the membranes in dH<sub>2</sub>O 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.
 

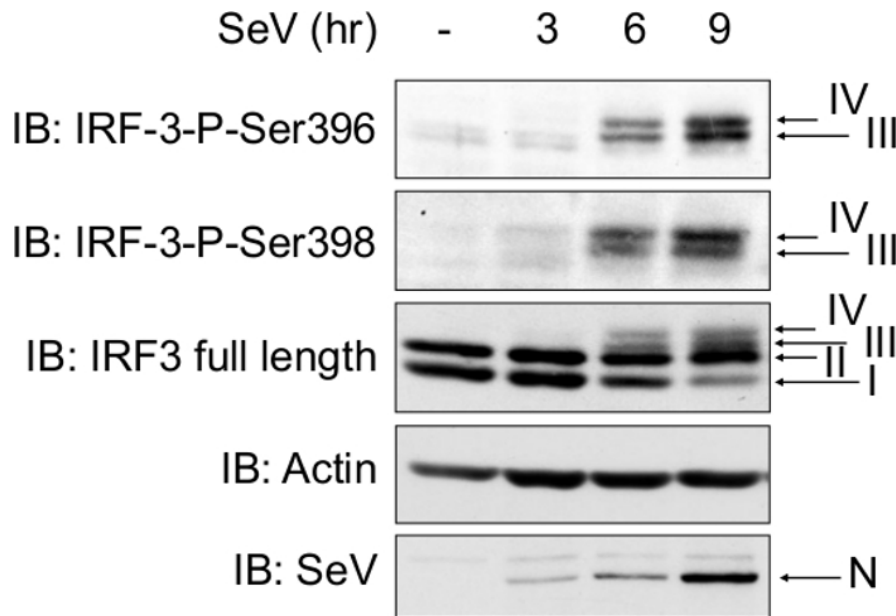
NOTE: At this step the membranes can be kept dry. However, if further stripping is required, it is better to perform the stripping before drying the membrane. Membranes can also be stored for short-term in PBS.
17. For the membranes that do not require stripping between incubation with antibodies (see **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%  $\beta$ -mercaptoethanol in ddH<sub>2</sub>O 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**.

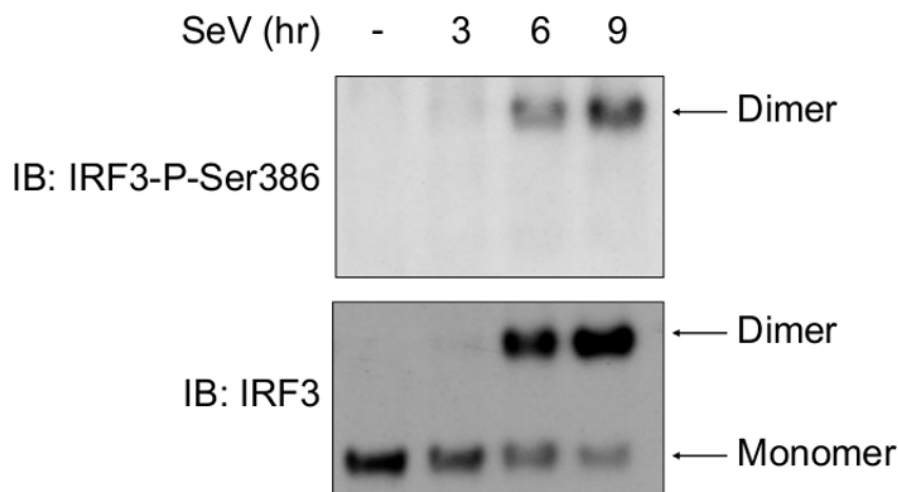
## Representative Results

**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 (IRF-3-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-PAGE<sup>15</sup>. 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 phosphorylation<sup>10</sup>. Importantly, this also allows discriminating between Ser396 phosphorylated species that do not exhibit dimerization, but are transcriptionally active<sup>10</sup>. 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/p300<sup>27</sup>. 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 ddH<sub>2</sub>O. 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 Ser386<sup>9</sup>, Ser396<sup>19</sup> and Ser398<sup>15</sup>. 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<sup>6,9,10,19,21</sup>. 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  $\mu$ g 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 IRF3<sup>9</sup>, 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-PAGE<sup>20</sup>. 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 $\epsilon$ /TBK1-phosphorylated IRF3<sup>10,21,28</sup>. 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<sup>11,13</sup>. 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<sup>14,20</sup>.

IRF3 activity is terminated by proteasome-mediated degradation of hyperphosphorylated forms<sup>11,17</sup>. 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/10<sup>6</sup> 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 treatment<sup>29</sup>. 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 degraded<sup>30</sup>.

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<sup>10,20,21</sup>. 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

- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Takahashi, K. *et al.* X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol.* **10** (11), 922-927 (2003).
- Mori, M. *et al.* Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem.* **279** (11), 9698-9702 (2004).
- 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).
- 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. Takahashi, 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. Oliere, 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).

## **Annexe II - Contribution à un autre article scientifique**

### **Proteasome activity within apoptotic exosome-like vesicles: a novel trigger for tertiary lymphoid structure formation and aggravation of rejection**

Article en préparation pour publication avec comité de lecture à *Science Translational Medicine*.

#### **Auteurs : liste**

Mélanie Dieudé, Julie Turgeon, Annie Karakeussian Rimbaut, Geneviève Marcoux, Alexa C. Robitaille, Déborah Beillevaire, Sarita Negi, Alissa K. Rutman, Herman S. Overkleeft, Bogdan I. Florea, Shijie Qi, Nathalie Patey, Jean Tchervenkov, Louis A. Gaboury, Nathalie Grandvaux, Steven Parakevas, Éric Boilard et Marie-Josée Hébert.

#### **Contribution des auteurs**

Cet article décrit l'implication des « Apoptotic exosomes like vesicles » (ApoExo) dans le mécanisme auto-immun induit par les lésions d'ischémie-reperfusion après une transplantation rénale et causant le rejet d'organes. Ma contribution à cet article consiste à l'exécution et l'analyse de l'expérience de quantification de 36 cytokines basée sur la technologie Luminex xMAP sur le sérum de souris injectées avec des ApoExo, des corps apoptotiques ou un véhicule. Cette expérience a permis d'identifier la voie de signalisation qui contrôle l'activité auto-immune des ApoExo.

## **Abstract**

Ischemia-reperfusion injury (IRI) is an important trigger for the production of autoantibodies which can in turn aggravate tissue damage. The mechanisms controlling IRI-induced autoantibody production remain ill defined. Apoptosis of vascular cells leads to the release of apoptotic exosome like vesicles (ApoExo), a novel type of membrane vesicle characterized by expression of active 20S proteasome core complex. Here, we show a significant correlation between the release of ApoExo by human kidneys and degree of ischemia. To explore the autoimmune mechanisms triggered by ApoExo, we studied the activity of murine endothelial ApoExo injected to naïve mice or mice transplanted with an allogeneic aortic graft. ApoExos trigger activation of the IL-17 axis and autoantibody formation in naïve and transplanted mice. In the latter, ApoExo aggravate rejection and induce the formation of tertiary lymphoid structures around vascular allografts. We also identify gamma delta T cells as a pivotal sensor of ApoExo proteasome activity, which in turn leads to the formation of tertiary lymphoid structures. Use of gamma delta deficient mice or inhibition of proteasome activity of ApoExo with bortezomib both significantly reduced allograft IL-17 overexpression, tertiary lymphoid structure formation and autoantibody production. These results provide novel insights into the mechanisms of autoimmunity triggered by IRI and identify proteasome activity within ApoExo as a novel potential target of intervention.

