

Université de Montréal

**Étude de la régulation du facteur de transcription
NF- κ B dans l'infection par le RSV**

par

Alexis Martel

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. SC.)
en Biochimie

Janvier, 2010

© Alexis Martel, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de la régulation du facteur de transcription
NF- κ B dans l'infection par le RSV

présenté par :

Alexis Martel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, président-rapporteur
Nathalie Grandvaux, directeur de recherche
Gerardo Ferbeyre, membre du jury

Résumé

L'infection par le Virus Respiratoire Syncytial cause des affections pulmonaires aiguës en pédiatrie caractérisée par une réponse inflammatoire excessive médiée par la production de cytokines par les cellules épithéliales des voies aériennes. Les gènes codant pour ces cytokines sont régulés par le facteur de transcription NF- κ B (p50/p65) dont l'activation est classiquement induite par la phosphorylation de son inhibiteur I κ B α , ce qui permet l'accumulation de l'hétérodimère au noyau. Par contre, nous avons récemment identifié la phosphorylation en sérine 536 de la sous-unité p65 comme une autre étape essentielle à son activation lors de l'infection des AEC par RSV.

Le travail présenté dans ce mémoire a permis de démontrer que l'inhibition de l'expression de RIG-I, de Cardif ou de TRAF6, 3 protéines impliquées dans la reconnaissance cellulaire des virus, conduit à l'inhibition de cette phosphorylation en réponse à RSV. Nous avons également établi à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques et d'ARNi que, parmi les diverses kinases connues pour phosphoryler p65 en réponse à divers stimulus, IKK α/β sont essentielles à cette phosphorylation lors d'une stimulation par RSV. Puisque TRAF6 est bien connu dans la littérature pour activer le complexe IKK, nous proposons que TRAF6, après reconnaissance de l'ARN viral de RSV par RIG-I, active le complexe IKK qui induit la phosphorylation de la sous-unité p65 de NF- κ B, permettant l'expression de gènes cibles.

D'autre part, nous avons précédemment démontré que Nox2, un isoforme de NADPH oxydase, contrôle l'activation de NF- κ B en régulant les phosphorylations de I κ B α et p65. Nous montrons ici que l'inhibition de Nox2 réduit fortement l'activité du complexe kinase IKK. De plus, la présence au niveau basal de Nox2 est critique pour le niveau d'ARN messager de Cardif. Nous proposons donc que la régulation de la phosphorylation de p65 en ser536 par Nox2 soit via son effet sur Cardif en permettant la fonctionnalité de la voie RIG-I.

Mots clés : RSV, NF- κ B, voie RIG-I, Nox2

Abstract

The infection by the Respiratory Syncytial Virus causes acute respiratory tract affections among children characterized by an excessive inflammatory response mediated by airway epithelial cells production of cytokines. The genes coding for these cytokines are regulated by the transcription factor NF- κ B (p50/p65) which is classically activated by phosphorylation of its inhibitor I κ B α , permitting the nuclear accumulation of the heterodimer.

The work presented in this master's thesis allowed demonstrating that the inhibition of either RIG-I, Cardif or TRAF6, 3 proteins implicated in the cellular recognition of virus, leads to the inhibition of this phosphorylation in response to RSV. Moreover, we established with pharmacological inhibitors and siRNA that, among all kinases known to phosphorylate p65 in response to various stimulus, IKK α / β are essential to this phosphorylation in RSV stimulation. Since TRAF6 is a well-known IKK complex activator in the literature, we propose that TRAF6, after the recognition of the RSV viral RNA by RIG-I, activates the IKK complex which induces the phosphorylation of the NF- κ B subunit p65, allowing the expression of target genes.

Furthermore, we had previously demonstrated that Nox2, a NADPH oxidase isoform, controls the activation of NF- κ B by regulating the phosphorylation of I κ B α and p65. We show here that the inhibition of Nox2 by siRNA reduces strongly the activity of the IKK complex. Moreover, the basal level presence of Nox2 is critical for the messenger RNA level of Cardif. Thus, we propose that the Nox2 regulation of p65 ser536 is done by its effect on Cardif, which allows the integrity of the RIG-I pathway.

Key words: RSV, NF- κ B, RIG-I pathway, Nox2

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 Le Virus Respiratoire Syncytial.....	2
1.1.1 Structure du virion.....	2
1.1.2 Rôle des protéines virales.....	3
1.1.3 Épidémiologie, traitements et pathologies associées au RSV.....	4
1.2 Le système de défenses immunitaires humain.....	7
1.2.1 La réponse immunitaire innée.....	7
1.2.2 La réponse immunitaire adaptative.....	10
1.2.3 La reconnaissance des virus à ARN lors de la réponse immunitaire innée.....	11
1.2.3.1 Les Toll-like receptors (TLRs).....	11
1.2.3.2 Les RIG-I like-receptors (RLRs).....	13
1.2.3.2.1 Signalisation en aval des RLRs.....	15
1.2.4 Mécanismes d'évasions principaux du RSV de la réponse immunitaire innée.....	19
1.3 Le Nuclear-Factor κ B (NF- κ B).....	20
1.3.1 Les structures du NF- κ B.....	20
1.3.2 Activation et régulation de NF- κ B.....	22
1.3.2.1 La voie canonique.....	23
1.3.2.2 La voie non-canonique.....	25
1.3.2.3 Modifications post-transcriptionnelles des sous-unités de NF- κ B	26
1.4 Les dérivés actifs de l'oxygène (ROS).....	28

1.4.1 Implication des ROS dans la régulation de NF- κ B.....	29
1.4.2 Les NADPH oxydases et leurs rôles dans la régulation de NF- κ B.....	30
1.5 Hypothèses et objectifs de travail.....	33
Chapitre 2 Matériels et méthodes.....	35
Chapitre 3 Résultats.....	44
3.1 Les kinases RSK-1, TBK-1 et IKK ϵ ne sont pas impliquées dans la phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV.....	45
3.2 Les kinases IKK α/β sont responsables de la phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV.....	47
3.3 La phosphorylation de p65 en sérine 536 et de I κ B α en sérine 32 en réponse à RSV est dépendante de RIG-I et Cardif.....	49
3.4 La phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV est aussi dépendante de TRAF6.....	52
3.5 L'enzyme Nox2 est essentielle à l'induction de la phosphorylation de p65 en sérine 536 et de I κ B α en sérine 32 en réponse à RSV.....	55
3.6 Nox2 agit en amont du complexe IKK dans la voie de signalisation menant à l'induction de p65 ser536 et I κ B α ser32 en réponse à RSV.....	57
3.7 L'absence de Nox2 réduit le niveau de détection de Cardif.....	59
3.8 L'absence de Nox2 réduit la quantité d'ARNm de Cardif présent dans les AEC.....	61
Chapitre 4 Discussion.....	65
Conclusion.....	73
Bibliographie.....	75

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des oligonucléotides ARNi utilisés dans cette étude.....	42
Tableau II : Liste des anticorps et de leurs conditions d'utilisation.....	43

Liste des figures

Figure 1-1 Structure schématique du RSV.....	2
Figure 1-2 Le système des Interférons de type 1.....	9
Figure 1-3 Les TLRs et leurs ligands.....	12
Figure 1-4 Structures primaires des RLRs.....	13
Figure 1-5 Résumé de la signalisation par les RLRs.....	18
Figure 1-6 Structures primaires des familles NF- κ B et I κ Bs	22
Figure 1-7 Structures primaires des membres de la famille IKK.....	24
Figure 1-8 Représentation schématique des enzymes Nox et Duox.....	31
Figure 3-1 Les kinases RSK-1, TBK-1 et IKK ϵ ne sont pas impliquées dans la phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV.....	46
Figure 3-2 Les kinases IKK α/β sont responsables de la phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV.....	48
Figure 3-3 La phosphorylation de p65 en sérine 536 et de I κ B α en sérine 32 en réponse à RSV est dépendante de RIG-I et Cardif.....	51
Figure 3-4 La phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV est aussi dépendante de TRAF6.....	54
Figure 3-5 L'enzyme Nox2 est essentielle à l'induction de la phosphorylation de p65 en sérine 536 et de I κ B α en sérine 32 en réponse à RSV.....	56
Figure 3-6 Nox2 agit en amont du complexe IKK dans la voie de signalisation menant à l'induction de p65 ser536 et I κ B α ser32 en réponse à RSV.....	58
Figure 3-7 L'absence de Nox2 réduit le niveau de détection de Cardif.....	60
Figure 3-8 L'absence de Nox2 réduit la quantité d'ARNm de Cardif présent dans les AEC.....	64
Figure 4-1 Résumé de l'étude.....	67

Liste des abréviations

2'-5' OAS	<i>oligoadenylate synthetase</i>
aa	acide aminée
ABC-DLBCL	<i>activated β-cell-like diffuse large β-cell lymphoma</i>
Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
AEC	<i>Airway Epithelial Cells</i>
Ang	angiotensine
ANK	<i>ankyrin domain</i>
AP-1	<i>Activated Protein-1</i>
APC	<i>Antigen Presentating Cells</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
BHA	<i>butylated hydroanisol</i>
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
β TrCP	<i>β-Transducin repeat Containing Protein</i>
Cardif	<i>CARD adaptor inducing IFNβ</i>
CARDs	<i>Caspase Activation and Recruitment Domains</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CC1	<i>Coiled-Coiled domain 1</i>
Cdc37	<i>Cell division cycle 37</i>
CGD	<i>Chronic Granulomatous Disease</i>
c-IAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
DD	<i>Death Domain</i>
ds	<i>double strand</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated MAPK</i>
FAD	<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GSH-OEt	<i>glutathione monoethyl ester</i>
GTP	Guanine tri-phosphate

HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HSP-90	<i>Heat-Shock Protein-90</i>
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN	<i>Interféron</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
I κ B	<i>Inhibitors of NF-κB</i>
IKK	<i>IκBs kinases</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IL-1R	<i>IL-1 Receptor</i>
IP-10	<i>Interferon-inducible protein-10</i>
IPS-1	<i>Interferon-β Promoter Stimulator 1</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
IRIV	<i>Immunostimulating Reconstituted Influenza Virosomes</i>
ISG	<i>IFN Stimulated Genes</i>
JAK	<i>Janus Tyrosine Kinase</i>
KO	<i>knockout</i>
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>
LRR	<i>Leucine-Rich Region</i>
LZ	<i>Leucine-Zipper-like motif</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation-Associates gene 5</i>
mDCs	<i>mature Dendritic Cells</i>
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblastes</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MxA	<i>Mixovirus resistance protein A</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>

NAC	<i>N-acetylcystein</i>
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBD	<i>NEMO-Binding Domain</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NES	<i>Nuclear Export Sequence</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in β-cells</i>
NHBE	<i>Normal Human Bronchiolar Cells</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Sequence</i>
Nox	NADPH oxydase
Nrf2	<i>NF-E2-related factor-2</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
Parp	Poly (ADP-ribose) polymérase
pDCs	<i>plasmacytoids Dendritic Cells</i>
PKC	Protéine Kinase C
PKR	<i>RNA-dependant protein kinase</i>
poly I :C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PP2	<i>Protein Phosphatase 2</i>
Protéine F	<i>Fusion protein</i>
Protéine G	<i>Large glycoprotein</i>
Protéine L	<i>Large RNA polymerase subunit</i>
Protéine M	<i>Matrix protein</i>
Protéine N	<i>Major nucleocapsid protein</i>
Protéine NS	<i>Non-Structural protein</i>
Protéine P	<i>Phosphoprotein</i>
Protéine SH	<i>Small hydrophobic protein</i>
PRR	<i>Prolin-Rich Region</i>
PRRs	<i>Pathogen Recognition Receptors</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
RD	<i>Regulatory Domain</i>

RHD	<i>Rel Homology Domain</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid Inducible Gene-I</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene domain</i>
RIP	<i>Receptor-Interacting Protein</i>
RLRs	<i>RIG-I-like Receptors</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RSK	<i>ribosomal protein S6 kinase</i>
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
SCF	<i>Skip1-Culin-Roc1/Rbx1/Hrt-1-F-box</i>
SeV	<i>Sendai Virus</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP-A	<i>Surfactant Proteins A</i>
ss	<i>single strand</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription protein</i>
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAD	<i>Transcription Activation Domain</i>
TAK	<i>TGF-beta Activated Kinase</i>
TBK-1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TIM	<i>TRAF-Interacting Motif</i>
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor domain</i>
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR	<i>TNF Receptor</i>
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNFR associated factor</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRIM25	<i>Tripartite motif protein 25</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VISA	<i>Virus-Induced Signaling Adapter</i>
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>

Remerciements

J'aimerais profiter de ces quelques lignes pour remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce projet ainsi qu'à l'écriture de ce mémoire.

Premièrement, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dr. Nathalie Grandvaux, pour m'avoir donné ma chance, d'avoir cru en moi et de m'avoir appuyé tout au long de ces années au cours desquelles j'ai ainsi pu acquérir une excellente expérience scientifique tout comme de nouvelles expériences de vie.

De plus, j'aimerais remercier toutes les personnes merveilleuses que cette maîtrise m'a permis de rencontrer. Anton, ton sens de l'humour et ta franche camaraderie ont permis de faire passer plus vite les longs soirs au laboratoire et j'espère pouvoir compter sur ton amitié pour encore plusieurs années (au moins quatre en tout cas). Nos deux futures mamans, Karin et Annick, si je me fie à l'excellence du maternage dont vous m'avez gratifié depuis notre rencontre, vous allez être des supers mamans, j'en suis certain! Merci aussi à Loubna, Ian, Malek et Laurent (bien qu'il soit parti vers d'autres cieux!) pour leur présence et pour leur aide technique, ainsi que pour la rédaction de ce mémoire. De plus, un merci bien spécial au 27 pour m'avoir permis d'ingurgiter ma ration de nouille et de bœuf trois fois par semaine pour 7,92\$.

J'aimerais aussi remercier mon coloc et mes amis qui m'ont appuyé durant ce périple. Bien que la majorité du temps vous ayez compris mes obligations ainsi que mes désistements, je vous remercie de m'avoir forcé, «à quelques reprises», d'oublier un peu mes études.

Finalement, j'aimerais profondément remercier ma mère, parce que tu m'as montré qu'il est possible de surmonter de grandes difficultés, mon père, parce que ces heures passées à travailler avec toi dehors sur les deux monstres ont vraiment été géniales et m'ont montré autre chose dans la vie, ma sœur, parce que ton rire et ta bonne humeur sont tellement rafraîchissants et ma blonde, Ori, parce que tu as toujours trouvé le moyen de me relever et de me faire voir les choses sous un autre angle. De plus, votre soutien, tantôt silencieux, tantôt empreint de sages paroles est tout un trésor.

Merci à tous

Alexis Martel

Chapitre 1 Introduction

1. 1 Le Virus Respiratoire Syncytial

1.1.1 Structure du virion

Le RSV, découvert en 1956, est un virus respiratoire membre du genre *Pneumovirus* de la famille Paramyxoviridae. Cette famille de virus comprend aussi les genres *Paramyxovirus* [ex : virus Sendai (SeV), virus parainfluenza de type 1,2 et 3 et virus ourlien] et *Morbilivirus*. Le RSV est un virus pléomorphique enveloppé de taille moyenne (200 nm) à ARN simple brin négatif. Cet ARN viral, associé à une nucléocapside dans une enveloppe lipidique, est formé de 15 000 nucléotides contenant 10 gènes différents codant chacun pour une unique protéine virale. La nucléocapside (protéines N, P et L) forme une hélice symétrique et l'enveloppe à double membrane lipidique est dérivée de la membrane plasmique de l'hôte et contient des protéines transmembranaires glycosylées virales (protéines F, G et SH), ainsi que des protéines virales associées (protéines M et M2) [1].

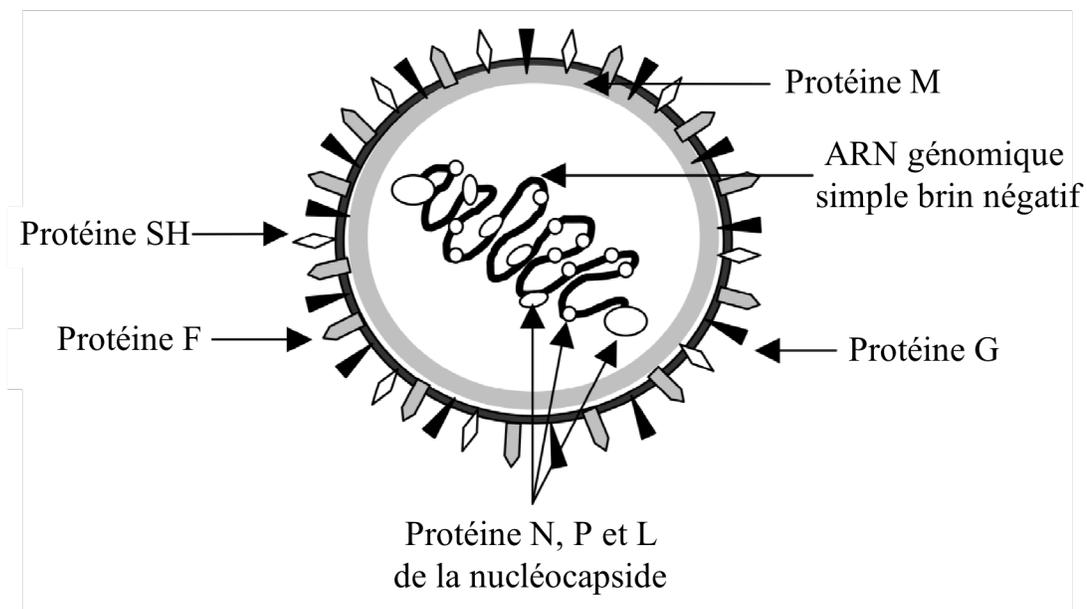


Figure 1-1 Structure schématique du RSV.

La représentation schématique ci-dessus montre le génome viral associé aux protéines formant la nucléocapside et le tout enveloppé par une membrane lipidique contenant différentes protéines virales.

Modifié de [1]

1.1.2 Rôle des protéines virales

Trois protéines du RSV se trouvent associées à l'ARN viral dans le virion, soit : N (*Major nucleocapsid protein*), P (*Phosphoprotein*) et L (*Large RNA polymerase subunit*). Ces trois protéines forment aussi l'unité minimale permettant la réplication de l'ARN viral. La protéine M (*Matrix protein*) est une protéine non-glycosylée associée à l'enveloppe et qui permettrait l'interaction entre la nucléocapside et l'enveloppe durant la morphogénèse du virion. Pour ce qui est des protéines transmembranaires, le rôle de la protéine SH (*Small hydrophobic protein*) n'a toujours pas été établi clairement. Par contre, les protéines G (*Large glycoprotein*) et F (*Fusion protein*) ont un rôle critique dans l'entrée du virus dans la cellule. En effet, selon le modèle actuel dans les cellules épithéliales des voies aériennes (les cellules cibles primaires du RSV), l'opsonisation du RSV par les SP-A (*Surfactant proteins A*), des molécules sécrétées par les cellules épithéliales, ainsi que le CD14 permettent à la protéine F d'interagir avec le TLR4 [2]. Cette interaction engendrerait le recrutement du récepteur CX3CR1, le récepteur de la chimiokine fractalkine, auquel la protéine hautement glycosylée G pourrait se lier permettant alors l'attachement du virus à la cellule [3]. Par contre, une récente étude présente l'annexin II comme un suspect alternatif pour la liaison de la protéine G [4]. De plus, probablement afin de stabiliser cet attachement, la protéine G possède un domaine de liaison à l'héparine, un glycoasminoglycan présent à la surface des cellules. L'interaction entre ces deux structures a été montrée pour être importante à l'infection *in vitro* [5]. Suite à l'attachement du virus à la cellule, la protéine F va permettre la pénétration du matériel viral dans la cellule par fusion membranaire. Elle engendre de plus par la suite, en coopération avec la petite GTPase RhoA, la fusion des membranes de cellules infectées avec des cellules adjacentes, engendrant la formation de syncytia, des structures d'où le virus tire son nom [6-8]. Ces syncytia permettent aussi la transmission virale intercellulaire. Ces deux protéines de surface sont les déterminants antigéniques majeurs du RSV.

En plus de ces 8 protéines structurales (protéines virales présentes dans le virion), le génome du RSV encode deux protéines non-structurales, NS (*Non-Structural*)1 et NS2. Bien qu'elles n'arrivent pas avec le virus lors de l'infection, leur niveau est rapidement augmenté puisque leur gène respectif sont les deux plus proches du promoteur dans le génome de RSV. Leur délétion atténue la réplication virale *in vitro* et *in vivo* [9]. Leur implication dans la réplication *in vivo* semble être fortement lié à leur capacité de bloquer la production d'Interférons de type 1 (IFN α/β) dans les cellules épithéliales et d'IFN de type 2 (IFN γ) dans les cellules phagocytaires [10], réduisant alors fortement la réponse antivirale. Elles ont par contre aussi été démontrées comme étant capable de supprimer l'apoptose cellulaire prématurée, permettant alors au virus de se répliquer plus longtemps, indépendamment des IFNs [11].

1.1.3 Épidémiologie , traitements et pathologies associées au RSV

Le RSV est le virus le plus important à travers le monde en pédiatrie pour les affections des voies respiratoires. Au cours de leur première année d'existence, 70% des enfants vont contracter ce virus [12] et virtuellement 100% vont l'avoir eu avant l'âge de 3 ans. Des suites de ces infections, un tiers de ces enfants vont développer une maladie grave des voies respiratoires inférieures, forçant 2,5% de ces derniers à être hospitalisés, ce qui en fait la cause majeure d'hospitalisation d'enfant dans les pays développés [13]. Les symptômes du RSV vont de l'otite ou de la pneumonie jusqu'à la bronchite, qui est une maladie grave des voies respiratoires inférieures à laquelle est associée un taux de morbidité et de mortalité substantiel [14]. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé à 64 millions le nombre d'infections et à 160 00 le nombre de décès annuels liés au RSV à travers le monde. De plus, seulement au Etats-Unis, le coût lié à l'hospitalisation des enfants et personnes âgées et immunosupprimées victimes de ce virus était estimé entre 356 et 585 millions\$ par année en 2001 [15].

Bien que l'OMS ait désigné le RSV comme pathogène à priorité élevée pour le développement de vaccin [16], aucun n'est encore disponible. Lors des premiers essais, dans les années soixante, un vaccin inactivé au formol a entraîné une augmentation du nombre de complications liées au RSV [17]. Depuis, de nombreuses approches ont été utilisées, dont des virus atténués ou introduits dans des vecteurs bactériens ou viraux, afin de contrebalancer le faible pouvoir immunogénique du RSV, mais sans causer le même type de réaction que le premier, sans mener à un vaccin approuvé. De récents tests, réussis dans la souris et actuellement à l'essai dans le sigmodon, utilisant la protéine F (beaucoup plus stable génétiquement entre les différentes souches de RSV que la protéine G) du RSV couplé à l'adjuvant IRIV (*immunostimulating reconstituted influenza virosomes*) semblent prometteurs [18, 19]. Malgré tout, les traitements actuels sont donc limités au soulagement des symptômes et à la prescription aux patients à hauts risques d'agents antiviraux tel que la Ribavirine, un analogue synthétique de la guanosine interférant avec la réplication du RSV, ou d'anticorps neutralisants spécifiques à RSV, tel que le Palivizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope antigénique de la protéine F et inhibant ainsi l'entrée du RSV dans la cellule [20].

Suite à l'exposition au virus RSV, via l'éternuement d'une personne infectée ou le contact avec une surface contaminée, le RSV infecte majoritairement les cellules épithéliales des voies aériennes (AEC) supérieures. Normalement, en réponse à un virus respiratoire, ces cellules épithéliales vont être responsables de la sécrétion de cytokines et de chimiokines (des cytokines à activité chimiotactique), qui vont alors établir, via des mécanismes autocrines (sur la cellule infectée) et paracrines (sur les cellules avoisinantes), un état antiviral permettant l'élimination du pathogène. Dans ce cadre, la destruction de quelques cellules épithéliales ciliées cause les symptômes caractéristiques d'une infection du type influenza. Par contre, chez les patients RSV, une grande quantité de cellules sont détruites, une augmentation des sécrétions et de l'infiltration de l'épithélium par des cellules inflammatoires est aussi notée [21] ce qui permet l'affection des AEC inférieures ainsi que de certaines des cellules infiltrantes (phagocytes, APC et fibroblastes). La combinaison de

l'augmentation des sécrétions et de la perméabilité capillaire ainsi que la diminution de l'élimination de ces sécrétions, due entre autre à une perte d'efficacité des cils mucosaux présent sur les cellules épithéliales ciliées, engendre une accumulation de débris cellulaires et de sécrétions dans les voies respiratoires inférieures, une condition caractéristique des infections des voies inférieures. Des études *in vitro* ont démontré que des cellules épithéliales bronchiques sécrétaient de plus haut niveau d'Interleukine (IL)-8, d'IL-6 et de RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted* ou CCL5), des cytokines et chimiokines proinflammatoires, en réponse au RSV qu'en réponse aux adénovirus de sérotype 3 et 7, deux autres virus respiratoires affectant les cellules épithéliales bronchiques [22]. De plus, le niveau de RANTES est représentatif de la sévérité de la pathologie produite par RSV dans un modèle murin [23] alors que les niveaux d'IL-8, RANTES et MIP-1 α (*Macrophage inflammatory protein-1 α* ou CCL3) détectés dans les lavages bronchoalvéolaires d'enfants infectés par le RSV corrèlent aussi avec la sévérité des symptômes. En ce sens, l'utilisation d'anticorps neutralisants contre RANTES ou de Met-RANTES (un compétiteur de RANTES pour son récepteur) réduisent les dommages aux voies respiratoires ainsi que le recrutement des cellules inflammatoires chez la souris [24, 25]. Enfin, des souris MIP-1 α KO (*knockout*) infectées par RSV ont montré une histopathologie pulmonaire réduite bien qu'aucune différence dans le titre viral n'ait été observée avec les souris de type sauvage [23]. Ainsi, la production par l'hôte d'une réponse inflammatoire excessive et inefficace à la clairance du virus est pressentie pour jouer un rôle majeur dans le développement des manifestations cliniques.

1.2 Le système de défenses immunitaires humain

Le système de défenses immunitaires permet à l'organisme de se prémunir entre autre contre différents micro-organismes tels que les bactéries et les virus. La première de ces défenses est donc généralement l'épithélium et les muqueuses, qui forment une barrière imperméable empêchant les microorganismes d'atteindre l'intérieur de l'organisme. Lorsque l'intégrité de cette barrière est affectée par l'infection, les cellules épithéliales initient la réponse immunitaire innée, une réponse non spécifique qui établira un environnement antiviral par l'expression et l'activation de molécules à activité antivirale telles que les IFN de type 1 et le système du complément ainsi que par le recrutement des phagocytes (macrophages, neutrophiles), des cellules NK (*Natural Killers*) et des pDC (*plasmacytoids Dendritic Cells*), des cellules généralement classifiées comme cellules présentatrices de l'antigène (APC). Cette réponse n'est toutefois pas toujours suffisante pour mener à l'élimination du virus. Pour pallier à ce problème, elle permet ensuite la formation de la réponse immunitaire adaptative, une réponse spécifique à un pathogène donné et composée de deux volets; la réponse humorale, constituée par les anticorps produits par les lymphocytes B et la réponse cytotoxique des lymphocytes T cytotoxique CD8+. Normalement, suite à cette réponse, l'établissement d'une résistance à une seconde infection par le même pathogène via la production de cellules mémoires est engendrée [26].

1.2.1 La réponse immunitaire innée

Lors de l'infection RSV, les cellules épithéliales des voies aériennes sont les premières à être infectées. La présence du virus va être détectée par ces cellules ainsi que par les cellules du système immunitaire déjà présentes sur place via la reconnaissance de structures conservées des molécules du pathogène (PAMPs) par divers récepteurs membranaires ou cytoplasmiques (PRRs). Ces derniers peuvent différencier certaines structures des pathogènes des molécules de l'hôte sans nécessiter une exposition préalable à un antigène spécifique [27]. Cette interaction

ligand-récepteur va, via diverses voies de signalisation, engendrer l'activation majoritaire de 3 facteurs de transcription : NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in β -cells*), IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) et AP-1 (*activated protein 1*) qui permettront l'expression d'un large éventail de gènes antiviraux et proinflammatoires dans le cadre de la réponse immunitaire innée immédiate.

IRF-3 est seul responsable de la production initiale d'IFN α_1 et d'autres gènes à activité antivirale (ISG56) alors que la coopération des 3 facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1 et IRF-3) avec divers coactivateurs, telle l'histone acétyltransférase CBP (*CREB binding protein*), est essentielle à la formation d'un 'enhanceosome' induisant l'expression de l'IFN β [28, 29]. Cette induction engendre une boucle d'amplification où les IFNs ainsi produits et sécrétés hors de la cellule vont lier, de manière autocrine et paracrine, le récepteur transmembranaire des IFNs (IFNAR : commun à tous les IFN de type 1). Ensuite, via la voie de signalisation Jak/Stat (*Janus Tyrosine Kinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription protein*), ils permettent l'expression d'IRF-7 qui lui-même engendre l'expression des 12 autres formes d'IFN α de même qu'amplifie l'expression d'IFN β [30].

Les IFN de type 1 agissent essentiellement de deux façons : ils inhibent premièrement la réplication virale et induisent dans un deuxième temps l'apoptose chez les cellules infectées. L'induction IFN α/β -dépendante du 2'-5' OAS (*oligoadenylate synthetase*), des protéines MxA (*Mixovirus resistance protein A*) et de la PKR (*RNA-dependant protein kinase*) permet l'inhibition de la réplication virale et la dégradation des composants viraux. Le système 2'-5' OAS inclut plusieurs enzymes et mène à un fort clivage des ARN simple brin viraux par l'ARNase L, ce qui ralentit considérablement le cycle viral [31]. Les MxA, des GTPases, bloquent la transcription virale en agissant sur la polymérase virale alors que PKR agit sur la traduction générale en phosphorylant eIF-2 α , ce qui inhibe la traduction en empêchant l'échange catalytique du nucléotide guanine de eIF-2B [31]. L'induction

IP-10) [2, 33] à activité proinflammatoire. Les cytokines, tel que le TNF- α , permettent la régulation de la mort cellulaire lors de l'infection, mais sont aussi importantes pour augmenter l'expression de molécules d'adhésions (P et E-selectin, et ICAM-1 et VCAM-1) sur l'endothélium des vaisseaux sanguins environnants. L'interaction faible de ces molécules avec les glycoprotéines présentes à la surface des leucocytes permet à ces derniers de mieux 'sentir' la présence de chimiokines, augmentant alors l'action de celles-ci [34, 35]. L'ensemble de l'expression de ces molécules engendrent une vasodilatation ainsi que le recrutement et l'activation des cellules phagocytaires du système immunitaire telles que les neutrophiles (IL-8), macrophages (MCP-1) et les éosinophiles (eotaxin-1) [36]. De plus, l'IFN de type 1 permet aussi l'activation des cellules NK [37] et des pDCs, qui vont à leur tour produire une quantité phénoménale d'IFN α/β [38]. La production d'IL-10 est un régulateur négatif de l'inflammation permettant normalement l'arrêt de l'inflammation. Considérant que la pathologie du RSV semble être fonction de l'inflammation, que NF- κ B possède un rôle prépondérant dans cette réponse et que RSV induit une activation persistante de NF- κ B [39], étudier la régulation de ce facteur de transcription est des plus importante dans ce type d'infection.

1.2.2 La réponse immunitaire adaptative

Les cellules présentatrice d'antigène (APC), telles que les macrophages, les DCs et les lymphocytes B vont permettre l'activation des lymphocytes cytotoxiques T naïfs (n'ayant pas encore rencontré d'antigènes) en lymphocytes cytotoxiques auxiliaires (CD4+) et cytotoxiques T (CD8+) [40]. Les lymphocytes CD8+ provoquent l'apoptose des cellules infectées par la libération de perforines et de granzymes [40] alors que les lymphocytes CD4+, une fois activée par l'IL-12 produite par les mDCs, contribuent à l'activation des CD8+ par production et sécrétion d'IFN de type II (IFN γ) ainsi qu'à la stimulation des lymphocytes B. Par contre, le RSV peut éviter la réponse cytotoxique en bloquant cette sécrétion d'IFN γ [10, 41]. De plus, la formation d'une réponse mémoire, normalement formée par des lymphocytes persistants après l'infection, semble aussi être affectée [42] comme le

montre la faible protection à une seconde infection que produit une exposition au RSV et la difficulté de produire un vaccin.

1.2.3 La reconnaissance des virus à ARN lors de la réponse immunitaire innée

L'induction de la réponse immunitaire innée est engendrée lorsque l'hôte s'aperçoit qu'il est infecté. Cette prise de conscience est effectuée par la reconnaissance de PAMPs par les PRRs présents sur et dans la cellule agressée. Les cellules épithéliales, les premières cibles du virus, ainsi que les cellules du système immunitaire innée, recrutées au site d'infections, telles que les macrophages et les DC expriment un nombre limité de ces PRRs qui possèdent chacun leur voie de signalisation menant au but ultime : l'activation des 3 facteurs de transcription, NF- κ B, IRF-3 et AP-1 et l'expression subséquente d'IFN de type 1, de molécules à activité antivirale ainsi que de molécules proinflammatoires.

1.2.3.1 Les Toll-like receptors (TLRs)

Les TLRs (*Toll-like receptors*) sont une famille de récepteurs transmembranaires initialement découverts en 1996 dans la *Drosophila* [43]. Depuis que le premier homologue humain, TLR4, a été caractérisé, la famille s'est agrandie pour compter actuellement 10 membres capables de reconnaître les pathogènes extracellulaires et intraendosomaux [44]. De multiples répétitions d'un motif leucine-riche (LRR) sont présentes sur leur domaine extracellulaire alors que celui intracellulaire est homologue à la région cytoplasmique du récepteur de l'IL-1 (IL-1R), ainsi appelé le domaine *Toll/IL-1 receptor domain* (TIR). En fonction des différents TLR, les molécules contenant un domaine TIR recrutées à la membrane seront différentes, ce qui permet une spécificité de la réponse [45]. Les TLRs 3, 7 et 8, tous situés aux endosomes, sont connus pour reconnaître les virus à ARN par interaction spécifique avec leurs acides nucléiques [46].

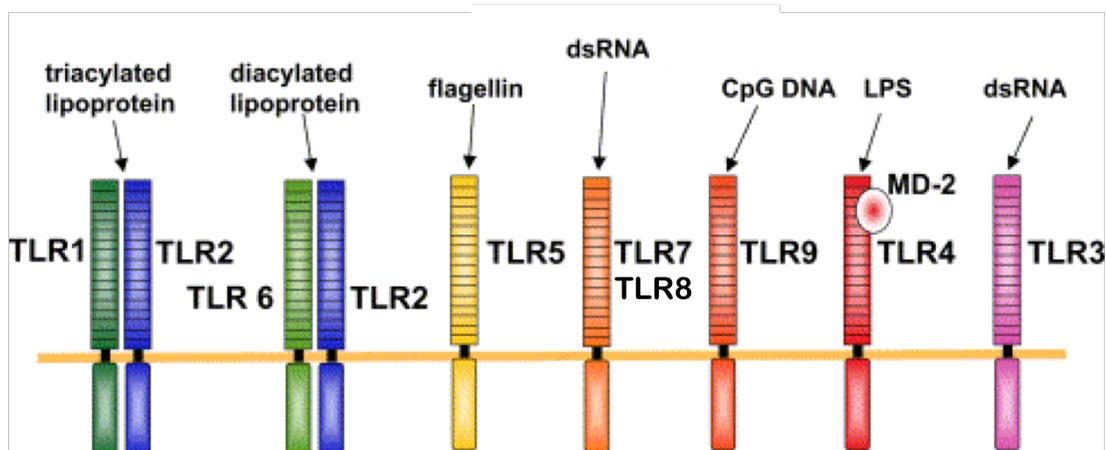


Figure 1-3. Les TLRs et leurs ligands.

Les TLRs reconnaissent des composants microbiens. Alors que les TLR1,2,4,5 et 6 sont spécialisés dans la reconnaissance de bactéries et de champignons, les TLR3,7 et 8 reconnaissent seulement des structures virales. Pour ce qui est du TLR9, il peut autant reconnaître des bactéries que des virus à ADN.

Modifié de [47]

La reconnaissance d'ARN simple brin (ss) par les TLR7/8 engendre le recrutement de l'adaptateur classique des TLRs, Myd88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), via son domaine TIR. Ce dernier recrute ensuite, via son domaine de mort (DD), les molécules IRAK(*Interleukin-1 receptor-associated kinase*)4-2 et 1 qui s'associent avec le TRAF(*TNFR-associated factors*)6 pour ensuite, via TAK(*TGF-beta activated kinase*)1, activer NF- κ B et AP-1. Ce mécanisme est appelé la voie Myd88-dépendante et est répandu chez tous les TLRs, sauf le TLR3 [46]. L'activation des TLR 7 et 8 permet aussi l'activation d'IRF-7. Il est important de noter que ces deux TLRs sont exprimés entre autre dans les macrophages et les DCs, mais sont absents des cellules épithéliales [48]. Pour sa part, TLR3 reconnaît les ARN double brin (ds) et sa protéine adaptatrice est TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*). Cette dernière, via son domaine N-terminal, recrute TRAF6 et TAK1 pour activer NF- κ B [49]. En recrutant plutôt TRAF3, TLR3 peut activer IRF-3 [46].

Le TLR3 a été démontré comme étant fortement induit en réponse à RSV dans des cellules épithéliales humaines [50] ainsi que dans les poumons de souris inoculées intranasalement avec du RSV vivant [51]. De plus, une diminution des niveaux de RANTES et de IP-10 produits lors d'une infection RSV de cellules épithéliales transfectées avec un ARNi spécifique pour TLR-3 a été montrée [52]. Par contre, aucune différence dans le titre viral de RSV entre des souris TLR3 KO et des souris sauvages n'a été observée bien qu'une altération de la production de mucus ait été notée [53], semblant indiquer que TLR3 ne joue pas un rôle direct dans la clairance virale, mais bien dans la réponse au virus. Enfin, le TLR4, exprimé à la surface des cellules épithéliales et dont le ligand classique est le lipopolysaccharide (LPS), a aussi été démontré comme étant capable de reconnaître la protéine de surface F du RSV, entraînant rapidement au cours de l'infection, via des mécanismes Myd88-dépendant et TRIF-dépendant, l'activation de l'activité transactivatrice de NF- κ B [2, 54].

1.2.3.2 Les RIG-I-like receptors (RLRs)

Récemment (2004), une voie parallèle aux TLR3,7 et 8 a été mise à jour. Les *Retinoic acid inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs)* sont des hélicases cytoplasmiques induites par les IFNs. Cette famille de molécules est capable de reconnaître la présence d'ARN viral et d'activer un promoteur IFN en réponse à de l'ARNds synthétique, le *polyinosinic-polycytidylic acid (polyI :C)* [55, 56]. RIG-I et MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associates gene 5*) possèdent 2 domaines CARDS (*Caspase Activation and Recruitment Domains*) à leur extrémité N-terminale alors qu'ils possèdent un domaine DExD/H-Box ARN hélicase en plus d'un domaine régulateur (RD) en C-terminal. Alors que leurs domaines CARDS servent à transmettre le signal et que le RD sert à inhiber leur activation en absence de virus, le domaine hélicase permet l'interaction avec des types d'ARN spécifiques.

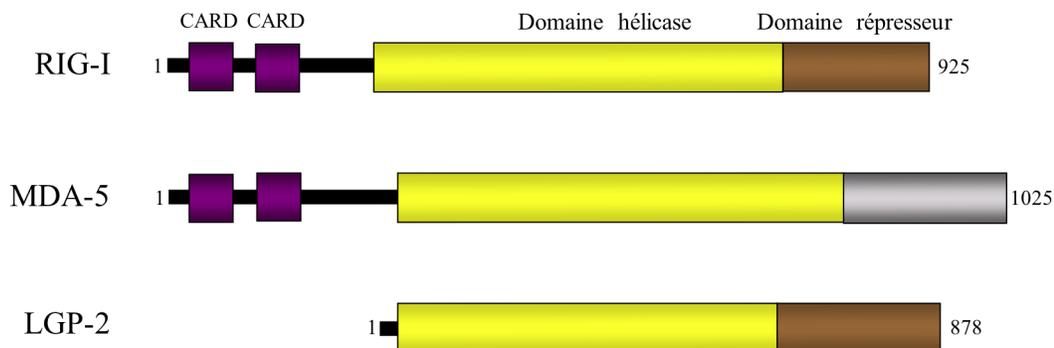


Figure 1-4. Structure primaire des RLRs.

Les trois RLRs possèdent un domaine DExD/H-ARN hélicase fonctionnel leur permettant d'interagir avec l'ARN. Par contre, seulement RIG-I et MDA-5 contiennent un tandem de domaine CARD en N-terminal leur permettant de faire poursuivre le signal.

Inspirée de [57]

En corrélation avec cette spécificité du domaine hélicase, dans des MEFs (*mouse embryonic fibroblastes*) où RIG-I a été inactivé par ablation génétique (MEFs RIG-I KO) en réponse à certain *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* et *Flaviridae*, l'induction d'IFN α/β a été inhibée. À l'inverse, cette expression dans des MEFs MDA-5 KO a plutôt été affectée en réponse à des *Picornaviridae* et des *Noroviridae* [58]. Certain virus (comme le *Paramyxovirus* SeV, les *Reovirus* et les *Flavivirus*) semblent nécessiter les deux [59] indiquant une implication de ces deux RLRs spécifique au virus présent. Il semblerait que les réponses différentielles de ces deux RLRs soient basées sur une différence dans les ARN reconnus. En effet, RIG-I lie les ARNs courts (<25pb) et les 5'-triphosphates (normalement masqués par la coiffe sur les ARN de l'hôte) alors que MDA-5 lie les ARNs longs [60, 61]. Les ARNs n'existent pas normalement dans le cytoplasme mais s'accumulent lors de la réplication virale. Selon le modèle actuel, l'activation de RIG-I et MDA-5 se ferait en plusieurs étapes. La liaison d'un ARNs au niveau du domaine C-terminal induirait l'activité ATPase du domaine hélicase, engendrant un changement conformationnel qui exposerait le domaine CARD, normalement masqué par le RD, ce qui lui

permettrait d'interagir avec d'autres molécules via une interaction CARD-CARD [62]. Au niveau de l'activation spécifique de RIG-I par détection d'un 5'-triphosphate, un mécanisme dépendant de l'homodimérisation de RIG-I serait impliqué [63]. Le dernier membre des RLRs est LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*). L'absence de domaine CARD semble lui conférer un rôle d'inhibition dans la signalisation des RLRs [64]. Bien que le mécanisme ne soit pas connu, les possibilités de formation d'hétérodimères et de compétition avec les adaptateurs en aval sont avancées [65, 66].

1.2.3.2.1 Signalisation en aval des RLRs

Suite à l'exposition de leur domaine CARD par interaction avec l'ARN viral, RIG-I et MDA-5 ont été montrés pour se lier avec l'adaptateur Cardif (MAVS, IPS-1, VISA) via leur domaine CARD respectif [67-70]. Par contre, dans l'unique cas de RIG-I, il lui est nécessaire de subir une poly-ubiquitination liée en Lys63 de sa lysine 172 par la E3 ubiquitine ligase TRIM25 (*tripartite motif protein 25*) avant de pouvoir lier Cardif [71]. Cardif (*CARD adaptor inducing IFN β*) possède un motif CARD à son N-terminal ainsi qu'un domaine proline-riche (PRR) en son milieu. Il est lié à la membrane externe de la mitochondrie via un court domaine membranaire à son C-terminal [68]. Cette localisation cellulaire semble être absolument essentielle à son activité. Par exemple, la protéase NS3/4A de HCV peut justement cliver Cardif à côté de son domaine membranaire et ainsi changer sa localisation vers le cytoplasme, inhibant alors l'activation de IRF-3 et NF- κ B [72]. Par contre, tout récemment, le groupe de recherche du Dr Lamarre, associé à l'Université de Montréal, a apporté une explication différente à ce phénomène. À l'aide du FRET et du BRET, ils ont démontré que Cardif oligomérisait en réponse au virus SeV et l'importance de ce mécanisme pour l'activation de IRF-3 et NF- κ B. De plus, le domaine membranaire de Cardif serait responsable de cette dimérisation, reléguant alors la mitochondrie à un simple rôle de support spatial. Ce modèle concorde avec l'action de NS3/4A sur le domaine membranaire [73].

Il semblerait qu'il existe, en plus de la forme complète, 3 variants d'épissage de Cardif, ce qui concorderait avec la détection de multiples bandes après séparation par SDS-PAGE alors même que Cardif est encodé par un seul gène à 6 exons [68, 70, 72]. Ces variants seraient plutôt cytoplasmiques, par absence de domaine membranaire, et auraient des actions diverses. MAVS 1a, un variant causé par un *frame-shift* ayant éliminé l'exon 2 et créé l'apparition d'un codon stop, semble avoir une action inhibitrice sur IRF-3 et NF- κ B. Pour sa part, MAVS 1b, un variant créé suite à la délétion de l'exon 3 et à l'apparition d'un codon stop, active sélectivement un promoteur IFN β par rapport à un promoteur IL-8. Enfin, MAVS 1c, un variant manquant uniquement le domaine membranaire, est complètement inactif [74].

Suite à l'activation de RIG-I/MDA-5 et à leur liaison avec Cardif, diverses protéines ont été montrées pour être recrutées au niveau de cet adaptateur. En effet, Cardif possède 3 TIM (*TRAF-interacting motif*) au niveau de son PRR. L'un de ces TIM semble recruter préférentiellement TRAF2 et TRAF3 [70, 75] alors qu'un autre est préférentiellement impliqué dans le recrutement de TRAF6 [70]. Les TRAFs, *Tumour Necrosis Factor Receptor (TNFR)-associated factors*, sont des protéines cytoplasmiques qui, comme leurs noms l'indiquent, sont classiquement connues pour être recrutées au niveau des TNFR. Six membres sont actuellement recensés. Ils possèdent généralement un domaine C-terminal permettant l'association avec leurs récepteurs, ainsi qu'un domaine doigt de zinc de longueur variable responsable de l'association avec diverses protéines de la signalisation [76]. De plus, un domaine N-terminal RING (*Really Interesting New Gene domain*) riche en cystéine est critique pour la signalisation. Ce domaine possède une activité E3 ubiquitine ligase. Actuellement, le rôle spécifique de chacun des TRAFs connues pour être recrutés à CARDIF n'est pas encore tout à fait clair, mais l'assemblage de divers complexes sur Cardif semblerait être la source de la divergence entre la signalisation antivirale (IRF-3/7) et inflammatoire (NF- κ B). L'utilisation de MEFs TRAF3^{-/-} a ainsi montré une diminution de production d'IFN de type 1, sans pour autant montrer d'effet sur NF- κ B [75, 77]. De plus, TRAF3 interagit avec TBK-1 et IKK ϵ qui sont reconnues pour phosphoryler et activer IRF-3/7 [77]. Bien que TRAF2 ait été montré pour lier Cardif,

l'étude de son rôle dans cette voie de signalisation est peu avancée. Par contre, il est très bien connu pour médier l'activation de NF- κ B en réponse à une stimulation par le TNF α via son activation ubiquitine-dépendante du complexe IKK [78]. Enfin, bien que la mutation sur Cardif du site de liaison de TRAF6 inhibe substantiellement l'induction de l'activité transactivatrice de NF- κ B [70], son implication dans l'activation de NF- κ B dépendante de Cardif est controversée [64, 79, 80]. Par contre, TRAF6 est très bien caractérisé pour être responsable de l'activation de NF- κ B en réponse aux TLR7/9 ainsi qu'à l'IL-1, alors qu'une fois recruté, il catalyse la formation d'une chaîne d'ubiquitine liée en Lys63 sur lui-même et IKK γ [81], permettant le recrutement d'un complexe formé de TAK1 et des *TAK1-binding protein*(TAB)2/3 qui active le complexe IKK chargé de l'activation classique de NF- κ B [82, 83].

De plus, une interaction entre Cardif et la protéine TRADD (*TNFR-associated death domain*) a récemment été montrée pour être importante dans l'induction de l'activation de NF- κ B [84]. L'inhibition de TRADD inhibe la production d'IFN β en réponse au virus VSV. TRADD recrute FADD (*Fas-associated death domain*) et RIP-1 (*receptor-interacting protein 1*), des protéines contenant des DD classiquement associées à la signalisation inflammatoire des TNFR, qui avaient été montrées pour être importantes dans la réponse au virus à ARNs [85] et pour interagir avec Cardif [69]. Le recrutement de toutes ces protéines forme une structure appelée le «TRADDosome» qui engendre le clivage et l'activation des caspases 8 et 10 [86] et ainsi l'activation du complexe IKK. La formation du TRADDosome en réponse au virus à ARN serait donc impliquée dans l'activation de NF- κ B.

Peu d'études ont actuellement été menées sur le rôle exact des RLRs dans l'infection RSV, mais une augmentation de l'expression de RIG-I et MDA-5 a été observée dans les lavages nasopharyngiques d'enfants infectés par RSV [87]. Par contre, l'implication de ces deux RLRs dans l'infection RSV semble être, tout comme dans le cas de la majorité des autres virus, différentielle puisque l'inhibition de l'expression de RIG-I dans des cellules de souris a mené à une augmentation du titre

de RSV alors qu'une semblable inhibition de MDA-5 n'a eu aucun effet sur cette donnée [59]. De plus, l'inhibition de RIG-I par ARNi dans des cellules épithéliales a causé une réduction de l'expression de RANTES, IP-10 et TLR3 selon un mécanisme NF- κ B et IRF-3 dépendant, indiquant une action de RIG-I préalable à celle de TLR3 [88]. Pour ce qui est des acteurs en aval des RLRs, seul le rôle de Cardif a été questionné à ce jour. En effet, l'infection de souris Cardif KO par le RSV a mené à une expression d'IFN de type 1 ainsi que de RANTES inférieure à celle dans les souris sauvages [89]. Étrangement, ces mêmes souris ont pu générer par la suite une réponse T cytotoxique normale.

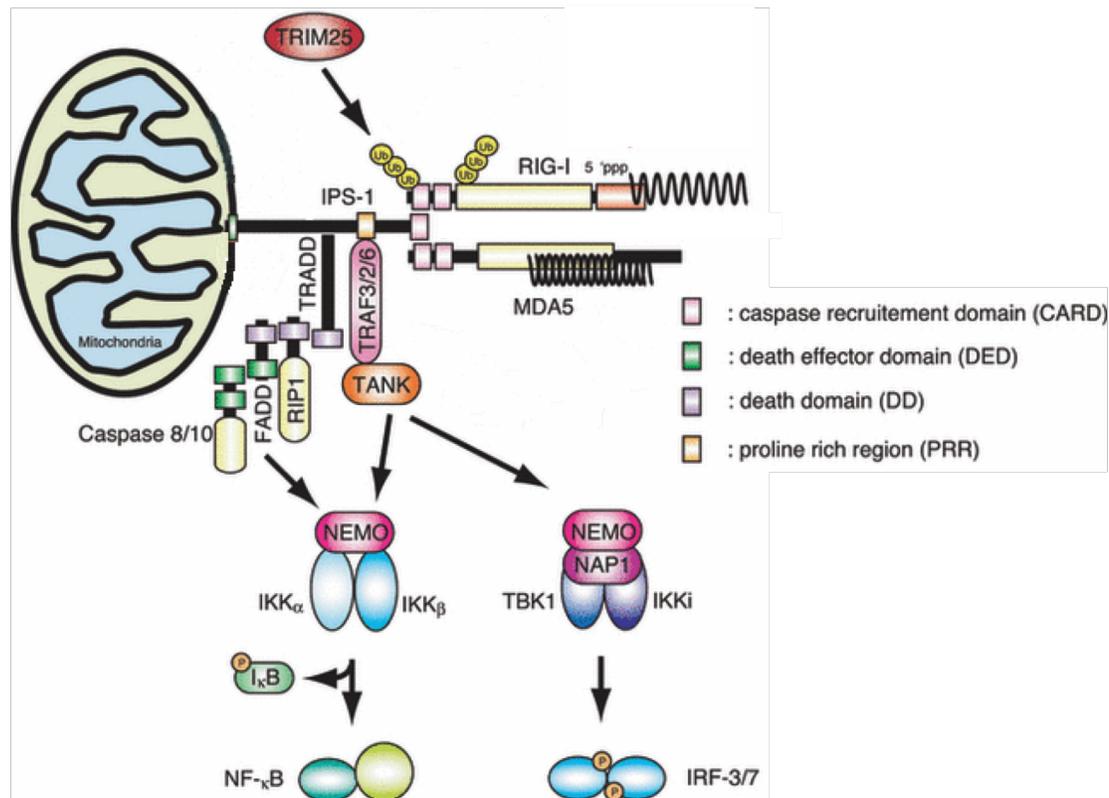


Figure 1-5. Résumé de la signalisation par les RLRs.

Suite à la reconnaissance de l'ARN viral, RIG-I et MDA-5 interagissent avec Cardif, ce qui induit le recrutement de différents TRAFs et de TRADD, permettant l'assemblage de complexes spécifiques transmettant le signal jusqu'à NF- κ B et IRF-3/7.

Modifié de [62]

1.2.4 Mécanismes d'évasions principaux du RSV de la réponse immunitaire innée

La grande majorité des virus ont développé des mécanismes leur permettant de s'évader de la réponse immunitaire innée en l'inhibant. Par exemple, le virus de l'hépatite C inhibe la voie RIG-I-dépendante à l'aide de sa protéase NS3/4A qui clive en C-terminal l'adaptateur Cardif [72], alors que la protéine V des *Paramyxovirus* lie MDA-5 au niveau de son domaine hélicase, l'empêchant ainsi de reconnaître l'ARN viral [90, 91]. RSV est quant à lui un faible inducteur d'IFNs. Par contre, l'utilisation de virus mutant n'exprimant plus NS1, NS2 ou ces deux protéines a engendré une forte expression d'IFNs dans des cellules épithéliales ainsi que dans des macrophages [10], suggérant un rôle important de ces deux protéines virales dans l'inhibition des IFNs. Subséquemment, NS1 a été montré pour induire la dégradation de STAT2 [92], une molécule essentielle de la voie Jak/STAT responsable de l'amplification d'expression des IFNs, via son ubiquitination et dégradation protéasome-dépendante [93]. Pour ce qui est de NS2, elle a récemment été montrée pour pouvoir lier le domaine CARD présent en N-terminal de RIG-I, lui permettant alors de compétitionner avec Cardif pour ce domaine de liaison et ainsi inhiber cette voie et la production d'IFN de type 1 dans un modèle de cellules épithéliales humaines (*Human Embryonic Kidney 293T*) [94]. De plus, NS1 et NS2 ont été montrées pour induire la dégradation de TRAF3 et IKK ϵ via un mécanisme encore inconnue [95]. Différemment, la protéine G soluble du RSV, une plus petite protéine G sécrétée par les cellules infectées [96], a été récemment montrée pour inhiber l'activation d'un promoteur IFN en réponse au LPS. Bien que le mécanisme reste à déterminer, les auteurs apportent l'hypothèse que le RSV inhiberait ainsi l'activation du TLR4 induite par la reconnaissance de la protéine F [97].

1.3 Le Nuclear-Factor κ B (NF- κ B)

NF- κ B est un facteur de transcription ubiquitaire impliqué dans l'immunité innée et adaptative, l'inflammation, les mécanismes anti et pro-apoptotique, la prolifération, la réponse à divers stress, ainsi que la progression cancéreuse [98]. Il existe 5 membres dans la famille NF- κ B qui forment différents complexes par leur homo ou hétérodimérisation. Ces complexes sont majoritairement maintenus inactifs dans le cytoplasme par la liaison d'inhibiteurs, les Inhibiteurs de NF- κ B (I κ Bs). Par contre, NF- κ B est classiquement activé par phosphorylation de ces inhibiteurs par le I κ B kinase (IKK) complexe, permettant alors au NF- κ B de transloquer au noyau, lier des séquences consensus κ B et d'induire la transcription d'un très large spectre de gène [99].

1.3.1 Les structures du NF- κ B

Dans les cellules humaines, la famille NF- κ B est formée de 5 membres : p50, p52, p65 (RelA), RelB et c-Rel possédant chacun en N-terminal le domaine caractéristique de cette famille, le RHD (*Rel homology domain*) qui est responsable de leur liaison à l'ADN ainsi que de leur homo et hétérodimérisation. De plus, les membres de la sous-famille des Rels (p65, RelB et c-Rel) possèdent aussi un TAD (*transcription activation domain*) unique à chacun en N-terminal qui est essentiel à l'activation de la transcription. Puisqu'ils ne possèdent pas ce domaine, les homo ou hétérodimères formés exclusivement de p50 et p52 répriment la transcription [99]. Les Rels sont normalement retrouvés dans le cytoplasme de cellules non-stimulées liées à un membre de la famille des I κ Bs. Cette famille comprend majoritairement 3 membres : I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ qui possèdent tous plusieurs répétitions d'un domaine ankyrine (ANK), un domaine d'interaction protéine-protéine de type hélice-boucle-hélice. L'interaction du I κ B, via ses domaines ANK, avec le Rel masque le domaine de localisation nucléaire (NLS) retrouvé dans le RHD de ce dernier, le maintenant ainsi dans le cytoplasme. De plus, le I κ B possède une séquence d'export nucléaire

(NES), ce qui permet de contrecarrer l'effet du NLS des sous-unités p50 et p52, auxquels les I κ Bs ne peuvent se lier, dans les hétérodimères Rel/p50 ou p52. Ceci induit un va et vient entre le noyau et le cytoplasme chez ces hétérodimères [100]. P50 et P52 sont quant à eux synthétisés sous forme de précurseurs, p105 et p100 respectivement, contenant des séquences ANK en C-terminal les retenant dans le cytoplasme. Ces séquences doivent absolument être clivées de manière protéasome-dépendante avant que p50 et p52 puissent agir à titre de facteurs de transcription. Le dernier membre des I κ Bs, Bcl-3, se retrouve alternativement dans le noyau et son interaction avec des homodimères p50 ou p52 leur permet un pouvoir transactivateur même si ces derniers ne possèdent pas de TAD [101]. Alors que RelB est uniquement retrouvé dans les cellules lymphoïdes et que c-Rel est limité aux cellules hématopoïétiques, la forme majoritairement retrouvée dans les cellules épithéliales est l'hétérodimère p50/p65 [102, 103]. De plus, seulement I κ B α et I κ B β sont exprimés dans ces cellules [104].

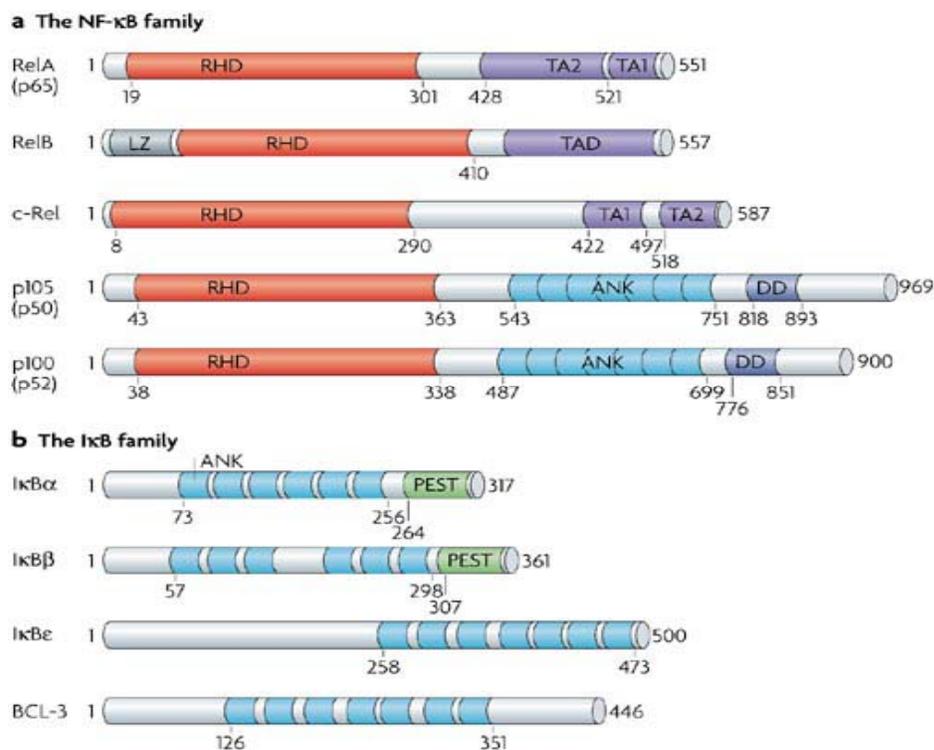


Figure 1-6. Structure primaires des familles NF- κ B et I κ Bs.

a. Les 5 membres de la famille NF- κ B possèdent un domaine RHD leur permettant de dimériser, de transloquer au noyau et de lier l'ADN. Les membres de la sous-famille Rel possèdent en plus un domaine TAD qui leur permet d'activer la transcription (TA1 et TA2 représentent des sous-domaines du TAD).

b. Comme p105 et p100, les 4 membres de la famille des I κ Bs contiennent des répétitions de domaine ANK qui leur permettent d'interagir avec les Rel, les maintenant ainsi dans le cytoplasme.

Modifié de [99]

1.3.2 Activation et régulation de NF- κ B

L'activation du facteur NF- κ B, de par les multiples formes sous lesquelles on le retrouve ainsi que par la multitude de stimuli le ciblant, est un phénomène complexe pouvant emprunter différentes voies impliquant chacune divers acteurs. Nous présentons ici les principales voies impliquées dans la réponse aux infections virales.

1.3.2.1 La voie canonique

Cette voie est considérée comme la voie «classique» d'activation de NF- κ B. Elle est caractérisée par une rapide phosphorylation en sérine 32 et 36 de I κ B α qui entraîne sa polyubiquitination liée en Lys48 par la β TrCP, un complexe enzymatique contenant le complexe E3 ubiquitine ligase SCF (Skip1-Culin-Roc1/Rbx1/Hrt-1-F-box), ce qui marque alors I κ B α pour la dégradation par la sous-unité 26S du protéasome. La dégradation de I κ B β et de I κ B ϵ est aussi soumise à ce genre de régulation bien que la suite d'événement soit plus lente puisque les kinases responsables de ces phosphorylations possèdent une plus faible affinité pour eux que pour I κ B α [105]. Une dégradation domaine PEST(riche en Proline, acide glutamique (E), Sérine et Thréonine)-dépendante par les calpaïnes est aussi rapportée [106, 107]. La dégradation du I κ B permet à l'hétérodimère contenant p65 de s'accumuler au noyau grâce à leur NLS et de lier des séquences cibles κ B. Le complexe kinase IKK, formé des deux sous-unités catalytiques IKK α (ou IKK-1) et IKK β (ou IKK-2) ainsi que de l'organisateur IKK γ (ou NEMO : *NF- κ B essential modulator*) est responsable des phosphorylations des I κ Bs. IKK α et IKK β possèdent 52% d'identité de séquence générale et 65% au niveau de leur domaine kinase. Ils hétérodimérisent via leur domaine LZ (*leucine-zipper-like motif*) bien que des homodimères IKK β aient été rapportés [108]. Bien que IKK β soit considéré comme la kinase principale des I κ Bs, un simple échange de son domaine NBD (*NEMO-binding domain*) en C-terminal de IKK α permet à ce dernier d'avoir un comportement semblable à IKK β [109], indiquant que l'interaction avec IKK γ est essentielle à la modulation de l'activité kinase de IKK. IKK γ ne possède aucune homologie de séquence avec les deux autres IKKs et interagit avec eux via un court segment présent au début du domaine CC1 (*coiled-coiled domain 1*). Son domaine C-terminal est responsable de son oligomérisation ainsi que de l'interaction avec les adaptateurs en amont.

Il est important de noter que bien que NF- κ B soit rapidement activé (activation des IKKs, liaison de p65 à l'ADN et expression de gènes cibles), la dégradation de I κ B α lors d'une infection par le RSV de cellules épithéliales ne corrèle pas avec cette activation et n'est observé que plus tardivement [110]. De plus, l'induction forcée de l'expression de I κ B α et l'inhibition de sa dégradation par blocage du protéasome n'ont bloqué que faiblement l'activation de NF- κ B lors de l'infection de A549 par RSV [111], indiquant la présence d'un mécanisme parallèle d'activation.

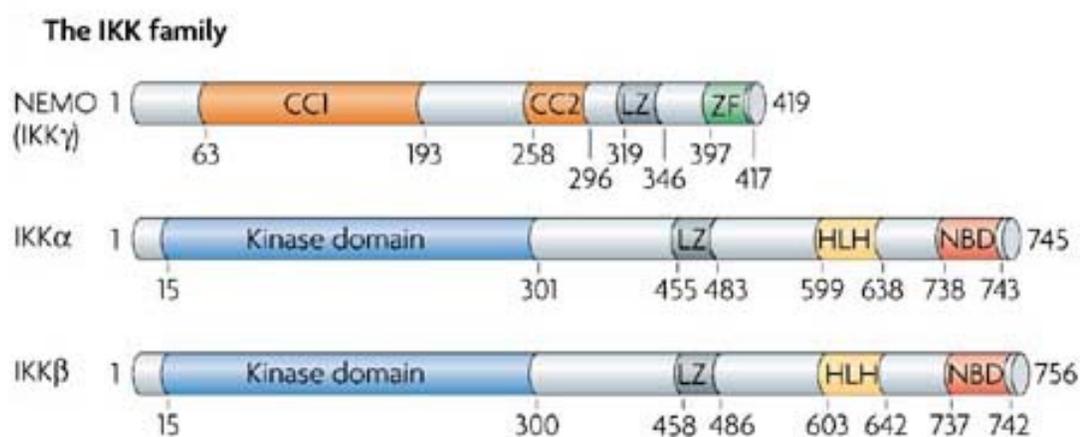


Figure 1-7. Structure primaire des membres de la famille IKK.

IKK α et IKK β possèdent un taux élevé d'homologie alors qu'ils n'ont aucune similitude avec IKK γ . Leur dimérisation se fait via leur domaine LZ et leur interaction avec IKK γ est dépendante de leur domaine NBD spécifique et de son CCI.

Modifié de [99]

Dans des cellules non-stimulées, les kinases IKKs sont maintenues inactives par leur interaction avec IKK γ . Suite à une stimulation, IKK γ va être ubiquitiné, entre autre par la famille des TRAFs, engendrant alors un site d'interaction avec une protéine RIP ainsi que l'oligomérisation de IKK γ [112, 113]. Ces événements engendrent un changement de conformation des IKKs, exposant les sérines d'une région de leur domaine kinase appelée la boucle T. La phosphorylation de ces sérines (ser177 et 181 pour IKK β et ser176 et 180 pour IKK α) est essentielle à leur

activation. Il n'est pas bien clair si ces phosphorylations seraient effectuées par un mécanisme de transautophosphorylation ou par une IKK kinase (TAK1 ?) [114]. L'arrêt de leur signalisation est induite par des phosphorylations de IKK γ en ser68 (dans le domaine d'interaction avec les IKK) et des IKKs au niveau du NBD, engendrant la dissolution du complexe [115]. Les chaperones HSP-90 et Cdc37 ainsi que les phosphatases PP2A et PP2C β sont impliquées dans la régénération du complexe [116, 117]. Par contre, les phosphatases PP2A et PP2C β ont aussi été montrées pour pouvoir déphosphoryler les boucles T de IKK α et IKK β , inhibant alors leur activité [118].

1.3.2.2 La voie non-canonique

P105 et p100 contiennent des répétitions de domaine ANK à leur C-terminal qui agissent de la même façon que les I κ Bs et doivent donc être éliminés avant de permettre l'activité de ces membres de la famille NF- κ B. Alors que la dégradation protéolytique du C-terminal de p105 est constitutive, probablement via un mécanisme co-translationnel [119], et génère continuellement un niveau de p50, celle de p100 doit être induite. Cette voie d'activation de NF- κ B est nommée voie non-canonique [101] et est médiée par des homodimères IKK α . Une fois activé par NIK (*NF- κ B-inducing kinase*), l'homodimère IKK α phosphoryle deux sérines en C-terminal de p100, ce qui induit sa polyubiquitination par la SCF^{TrCP} et sa protéolyse partielle par le protéasome [120]. Ce mécanisme d'activation est lent puisqu'il nécessite une synthèse protéique. En effet, NIK est continuellement ubiquitiné et dégradé par un complexe formé de TRAF2, TRAF3 et c-IAP1/2 (*cellular inhibitor of apoptosis*). Suite à l'activation de la voie, TRAF2, TRAF3 et potentiellement c-IAP sont dégradés, permettant au NIK nouvellement synthétisé de s'accumuler et d'activer IKK α [121, 122].

L'infection par le RSV de cellules épithéliales a été montrée pour induire la voie non-canonique. En effet, en réponse à 15h de RSV, des niveaux substantiels de NIK et de p52 ont été notés. De plus, l'inhibition par ARN interférence de NIK a inhibé cette production de p52 [123]. Étonnamment, ce mécanisme semble de plus être dépendant de RIG-I [124]. Par contre, p52 fait normalement partie d'hétérodimères avec RelB, absent des cellules épithéliales humaines, laissant alors à déterminer l'impact de cette voie dans la réponse au RSV.

1.3.2.3 Modifications post-transcriptionnelles des sous-unités de NF- κ B

En plus de l'élimination de leurs inhibiteurs, l'activation de NF- κ B passe par des modifications post-transcriptionnelles, telles que la phosphorylation, l'ubiquitinylation et l'acétylation, directes des sous-unités de ce facteur de transcription. Certaines de ces modifications augmentent le pouvoir transactivateurs, d'autres le diminuent ou permettent une meilleure liaison à l'ADN [125]. La sous-unité pour laquelle ces phénomènes sont les plus éclaircis et la plus importante dans les cellules épithéliales est p65. Actuellement, 9 sites de phosphorylation sont connus : 6 sérines et 3 thréonines. Trois de ces sites sont situés dans le RHD (ser276, ser311 et thr254) alors que les six autres sont dans le domaine de transactivation (ser468, ser529, ser535, ser536, thr435 et thr505).

Une phosphorylation sur seulement deux de ces sites a été observée en réponse au RSV. Alors que l'induction de la phosphorylation en ser276 est controversée, celle en ser536 est clairement admise [88, 126]. La phosphorylation de la ser276 avait précédemment été rapportée pour augmenter le pouvoir transactivateur en engendrant un meilleur recrutement d'histone acétyltransférase (HATs), comme CBP et p300, permettant une meilleure ouverture de l'ADN [127]. Elle pourrait de plus avoir un effet sur la dimérisation des sous-unités en favorisant la formation de certains dimères plutôt que d'autre [128].

La phosphorylation de la ser536 a déjà été montrée pour augmenter l'activité transcriptionnelle et la stabilité de NF- κ B [129, 130], mais une étude récente effectuée dans un modèle de cellules T humaines (Jurkat) a montré que les p65 phosphorylés en ser536 en réponse au PMA ou au TNF α n'interagissaient plus avec I κ B α , s'accumulaient ainsi au noyau et même régulaient un différent groupe de gène [131]. De plus, notre laboratoire a tout récemment démontré que cette phosphorylation prenait place aussi peu que 3 heures après l'infection de cellules épithéliales par deux différents *Paramyxoviridae* (SeV et RSV) et qu'elle était absolument essentielle au pouvoir transactivateur de NF- κ B puisqu'un mutant S536A n'activait plus un promoteur spécifique NF- κ B [126]. Hypothétiquement, cette phosphorylation pourrait représenter un mécanisme I κ B α -indépendant dans RSV. Enfin, ces deux phosphorylations directes de p65 ont été montrées pour être importantes à une modification subséquente, l'acétylation de p65 en lys310, par une augmentation de l'interaction avec p300, ce qui permettrait une meilleure activité de NF- κ B [132].

1.4 Les dérivés actifs de l'oxygène (ROS)

Bien que l'oxygène soit un composé essentiel à la vie humaine, ses dérivés actifs (ROS) dont le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical d'hydroxyle (OH^{\bullet}) ont longtemps été considérés comme des composés indésirables dans la cellule, probablement à cause de leurs effets néfastes sur l'ADN, les lipides et les protéines lorsqu'ils sont en excès (stress oxydatif) [133]. De plus, l'existence de protéines cellulaires permettant la dégradation de ces dérivés, telles que les superoxydes dismutases (SOD) 1-2-3, les catalases, glutathion peroxidases et peroxiredoxines, était en accord avec cette vision [134]. Les SOD sont une classe d'enzyme catalysant la dismutation des $O_2^{\bullet-}$ en oxygène et en peroxyde d'hydrogène et sont situées différenciellement dans la cellule. La SOD1 se retrouve dans le cytoplasme, la SOD2 est au niveau de la mitochondrie alors que la dernière est extracellulaire. Le deuxième groupe d'enzymes antioxydantes catalyse plutôt la décomposition du H_2O_2 en eau et en oxygène.

Il est désormais accepté que la production de ROS en faible quantité est importante pour la transduction du signal et la régulation de divers processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose et l'immunité innée [135]. En effet, les ROS sont pressentis pour moduler la conformation de protéine et l'activité de kinase et de phosphatases par l'oxydation de résidus cystéines spécifiques formant alors des thiols. Une formation de thiol au niveau du site catalytique de ces enzymes à base de cystéine entraîne classiquement l'inhibition irréversible de leur activité [136]. Par exemple, l'oxydation de la kinase $IKK\beta$ au niveau de sa cystéine 179 par le butein, un agent anti-tumoral retrouvé dans diverses plantes, a été démontrée comme étant capable de réguler négativement son activité [137].

1.4.1 Implication des ROS dans la régulation de NF- κ B

La première mise en évidence d'une régulation de NF- κ B par les ROS a été effectuée en 1991 lorsque Schreck et al. ont montré que l'addition de H₂O₂ au milieu de culture de cellules Jurkat activait NF- κ B [138]. De nombreuses études plus tard, synthétisées en [139, 140], l'idée que l'activation de NF- κ B en réponse au H₂O₂ était spécifique au type cellulaire a été émise. Dans les cellules épithéliales, une voie atypique d'activation de NF- κ B dépendante du complexe IKK en réponse au H₂O₂ a été décrite. L'activation Src-dépendante de Abl (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*) et de PKC (protéine kinase C) δ engendre la phosphorylation d'un résidu tyrosine (Y463) et de deux résidus sérines (S738 et S742) de PKD (*protein kinase D*) qui active à son tour le complexe IKK [141, 142].

Les ROS semblent avoir un rôle à jouer dans l'activation de NF- κ B en réponse au RSV dans des AEC. En ce sens, une induction de la production de ROS en réponse au RSV a été montrée *in vitro* [143] et des produits de peroxydation lipidique ont été détectés dans les lavages bronchoalvéolaires de souris infectées au RSV [144]. De plus, l'utilisation d'antioxydants chimiques, tels que le BHA (*butylated hydroanisol*) et le NAC (*N-acetylcystein*), ont diminué l'expression d'IL-8, de RANTES et de MCP-1, des protéines dont l'expression est sous contrôle de NF- κ B, dans des AEC [145-147]. L'utilisation du BHA a également diminué les symptômes de l'infection RSV chez la souris en réduisant la production de cytokines et chimiokines ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires [144]. Tout récemment, une étude dans des cellules A549 infecté par le RSV a montré que l'utilisation d'un agent réducteur dérivé de la glutathione (GSH), le GSH-OEt (*glutathione monoethyl ester*) pouvait inhiber la production d'IL-8, d'IL-6 et d'éotaxine [148].

1.4.2 Les NADPH oxydases et leurs rôles dans la régulation de NF- κ B

La production de ROS peut être soutenue par diverses enzymes telles que la chaîne respiratoire mitochondriale, la 5-lipoxygénase, la xanthine oxydase et les NADPH oxydases. De ces enzymes, la source majeure intentionnelle de ROS, c'est-à-dire qui ne représente pas un simple produit secondaire d'un mécanisme principal comme c'est le cas pour la chaîne de transport mitochondriale, se trouve à être les enzymes de la famille des NADPH oxydases dont l'expression est spécifique au type cellulaire [149]. La première NADPH oxydase fut découverte dans les cellules phagocytaires spécialisées où elle est formée d'un flavocytochrome b_{558} transmembranaire, constitué de gp91phox/Nox2 et de p22phox, ainsi que de deux coactivateurs cytosoliques, p47phox et p67phox [150]. Lors de son activation, les deux sous-unités cytosoliques sont phosphorylées, ce qui leur permet de s'associer à une protéine Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*) GTPase et de migrer à la membrane où ils permettent à gp91phox (qui contient un hème) de transférer l'électron du NADPH à une molécule d'oxygène, formant alors un superoxyde. Désormais, plusieurs isoformes de Nox sont connus [151, 152] soit Nox1, 3 et 4 très semblables à Nox2, ainsi que Nox5, contenant un domaine cytoplasmique de liaison au calcium (cet ion régule probablement son activité) et enfin les Duox1 et 2, beaucoup plus complexes, qui contiennent un domaine transmembranaire supplémentaire ainsi qu'un domaine extracellulaire à activité peroxydase. De même pour les régulateurs, un homologue de p47phox, Noxo1 (NOXOrganizer1), ainsi que de p67phox, Noxa1 (NOXActivator1) ont été décrits [150]. La nécessité des divers coactivateurs est extrêmement diversifiée à travers les membres de la famille [153].

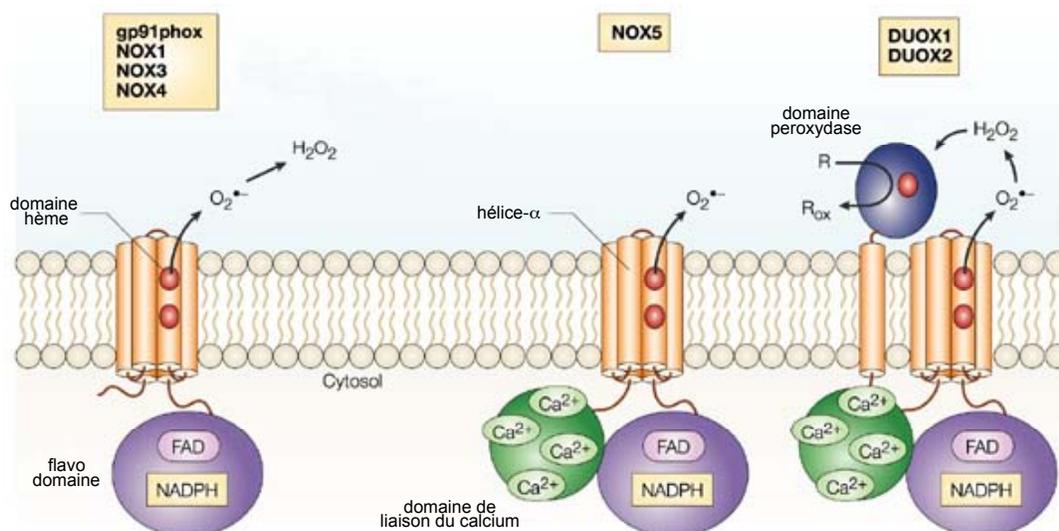


Figure 1-8. Représentation schématique des enzymes Nox et Duox.

Toutes les NADPH oxydases sont des protéines à plusieurs passages transmembranaires possédant un flavo domaine cytosolique leur permettant de lier le FAD et le NADPH et ainsi produire des superoxydes. Nox5 et les Duox possèdent de plus un domaine de liaison du calcium alors que ces derniers possèdent de plus un domaine peroxydase luminal.

Modifié de [150]

Le rôle le plus classique d'une NADPH oxydase est certainement la fonction anti-microbienne de Nox2 dans les phagosomes. La granulomatose septique progressive chronique (CGD) est caractérisée par une absence de cette activité et entraîne des infections graves récurrentes par divers germes, bactéries ou champignons [154]. Son nom lui vient de la formation de granulomes, qui sont des cellules géantes multinucléées constituées par la fusion de plusieurs macrophages ayant phagocytés des microbes, mais se trouvant dans l'impossibilité de les détruire. Il existe deux modes de transmissions principaux de cette maladie; l'un est lié au chromosome X et atteint directement le gène de Nox2 alors que l'autre est de type autosomique récessif et atteint p22phox, p47phox ou p67phox. Tous semblent posséder le même phénotype [155].

Les implications actuelles des NADPH oxydases dans la régulation de diverses voies de signalisation sont par contre bien plus étendues. Nox1 est pressenti pour avoir un rôle dans l'immunité innée de par son niveau basal élevé dans l'épithélium stomacale et par son induction en réponse au LPS [156]. Nox4 a pour sa part été associée à la signalisation TLR4-dépendante menant à l'activation de IRF-3 [157] et AP-1 [158]. Une étude menée dans une lignée cellulaire humaine de monocyte (U937) a montré que Nox4 jouait un rôle dans l'activation de NF- κ B en réponse au LPS via une interaction directe avec le TLR4 [159]. Cette interaction a ensuite été montrée pour impliquer le domaine C-terminal de Nox4 (acides aminés 451 à 530) ainsi que le domaine TIR de TLR4 [160]. De plus, Nox4 a été montré pour être important dans l'induction d'IL8 et de MCP-1 en réponse au LPS dans des cellules endothéliales aortiques humaines [160]. Malheureusement, l'expression de Nox4 dans les cellules épithéliales des voies aériennes est controversée [126, 161]. Pour ce qui est de Nox2, outre son rôle dans les phagosomes, il a été introduit dans l'immunité innée par son rôle dans l'induction de l'activité de NF- κ B en réponse au TNF α [162] et à l'IL-1 [163].

Bien que l'implication d'une NADPH oxydase dans la réponse ROS-dépendante des AEC à une infection RSV ait été suggérée par l'utilisation du DPI (diphénylèneiodonium) [126, 164], un inhibiteur des flavoprotéines, ce n'est que tout récemment que l'implication de Nox2 dans l'activation de NF- κ B en réponse au RSV a été montrée par notre laboratoire [126]. En effet, l'inhibition de Nox2 par ARN interférence dans des cellules A549 a montré une forte diminution de l'activité transactivatrice de NF- κ B, alors que la même stratégie contre Nox1 et Nox5 n'a produit aucun effet. De plus, la présence de Nox2 est absolument essentielle à la phosphorylation de p65 en sérine 536 et dans un modèle cellulaire (A549) et dans des cellules primaires (NHBE), démontrant le rôle crucial de Nox2 dans la régulation de NF- κ B en réponse au RSV.

1.5 Hypothèses et objectifs de travail

Le Virus Respiratoire Syncytial est l'agent pathogène causant le plus d'affections pulmonaires en pédiatrie au niveau mondial. Bien que l'OMS ait désigné le RSV comme pathogène à priorité élevée pour le développement de vaccin, aucun n'est encore disponible, indiquant la nécessité de mieux comprendre la réponse de l'organisme à ce virus. Une forte production de cytokines et chimiokines ainsi que le recrutement de cellules du système immunitaire innée sont observés en réponse à ce virus [21, 22]. La réduction de ces deux phénomènes permet de diminuer les symptômes subits par les patients et ainsi engendre un meilleur rétablissement [23-25]. Ceci implique alors l'induction d'une réponse inflammatoire excessive dans les causes des symptômes des infections RSV. L'inhibition des dérivés actifs de l'oxygène produits en réponse au RSV par traitement avec des antioxydants de toutes sortes permet de réduire cette réponse inflammatoire *in vitro*, ainsi que les symptômes *in vivo* [144-148]. Le facteur de transcription NF- κ B est le principal responsable de la réponse proinflammatoire produite lors de l'infection de cellules épithéliales des voies aériennes par RSV. Sa régulation initiale semble par contre fonctionner selon un mécanisme alternatif I κ B-indépendant inconnu [110, 111]. Tout récemment, la preuve de l'importance de la phosphorylation directe de p65 en sérine 536 dans l'infection RSV a été apportée [126]. De plus, la régulation de cette phosphorylation ainsi que celle de I κ B α par Nox2, une enzyme productrice de ROS, est capitale [126]. L'induction initiale de l'activité transactivatrice de NF- κ B en réponse au RSV étant dépendante de la voie RIG-I [88], nous avons posé l'hypothèse que cette voie est responsable de l'induction de p65 ser536 et que la régulation Nox2-dépendante de cette phosphorylation est aussi au niveau de cette voie.

- 1) Notre premier objectif est de déterminer clairement quelle kinase parmi les différentes déjà cataloguées dans la littérature est impliquée dans la phosphorylation de p65 ser536 dans l'infection RSV.

- 2) Puis, nous voulons déterminer l'implication de la voie RIG-I-dépendante dans ce mécanisme et établir clairement les différents éléments de cette dernière.
- 3) Enfin, nous voulons déterminer la cible de la régulation de Nox2 en vérifiant l'effet de l'inhibition de Nox2 sur les divers constituants de cette voie.

Chapitre 3 Matériels et méthodes

Réactifs

Le DMSO, Tween 20 et la BSA proviennent de Sigma-Aldrich. Le U0126 et le z-Vad-fmk proviennent de Biomol International. Le IKK-2 inhibitor IV et la lactacystine ont été achetés de Calbiochem alors que le BI-D1870 est un cadeau généreux du D^r. Roux (IRIC, Montréal, Québec). Les oligonucléotides utilisés comme amorces en PCR en temps réel proviennent de Invitrogen alors que les ARNi (Tableau I p.42) sont de Dharmacon.

Plasmides

Le plasmide rapporteur pRL-null *Renilla* luciférase a été obtenu de Promega. Le P2(2X)TK-pGL3 NF- κ B firefly luciférase provient du D^r.J. Hiscott (Université McGill, Montréal, Québec). Les plasmides utilisés pour quantifier le nombre de copie d'ARNm présente en PCR en temps réel, myc-Cardif-pcDNA3.1 et le fragment +748 à +980nucléotides de la β -actine généré par clonage dans le pCR2.1-TOPO par utilisation de *EcoR1* sont un cadeau du D^r.Lamarre (Université de Montréal, Montréal, Québec). Le pEGFP-C1 a été obtenue de Clontech alors que le myc-Rac1-N17-pRK5 provient du Dr. Marc Servant (Université de Montréal, Montréal Québec)

Cultures cellulaires

Les cellules A549 (ATCC) ont été cultivées dans du milieu F12 Ham (Gibco) auquel nous avons ajouté 10% de FBS (*Fetal bovine serum*) (Gibco) inactivé par un traitement à la chaleur ainsi que 1% de L-Glutamine (Gibco) et ont été cultivées de manière subconfluite (passage au 1/5). Les cellules NHBE (Clonetics) ont été cultivées dans du milieu BEGM (Clonetics) et utilisées seulement entre les passages 2 et 4. Les traitements à la lactacystine et au z-Vad-fmk ont été effectués dans du milieu F12 Ham 2% FBS et 1% L-Glutamine pour 16 h.

Transfections d'ARNi

Des cellules A549 ou NHBE de passage entre 2 et 3 à confluence d'environ 30% (1×10^5 cellules/35 mm ou 2×10^4 cellules/24 puits platées 24 h avant) ont été transfectées à l'aide de l'oligofectamine (Invitrogen), selon les instructions du fabricant, avec 200 pmol (10 μ l de 20 μ M) des ARNi (Tableau I) exception faite du siTBK-1/siIKK ϵ (figure 3-1 C p.46) et de siTRAF6/siTRAF6(2) (figure 3-4 B p.54) où seulement 100 pmol de chacun des deux ARNi a été utilisés. La transfection a été poursuivie pour 63 h avant l'infection.

Transfection de plasmides et essai luciférase

Des cellules A549 à environ 60% de confluence (8×10^4 cellules par 24 puits plater 24 h avant) ont été transfectées avec 1 μ g du plasmide d'expression indiqué avec le *TransIT-LT1* (Mirus) selon les instructions du fabricant avec un ratio ADN/réactif de transfection de 1/2.

48 h après la transfection d'ARNi ou 16 h après la transfection de plasmide d'expression, les 24 puits ont été transfectés avec 50 ng de pRL-null *Renilla* luciférase et 100 ng de P2(2X)TK-pGL3 NF- κ B firefly luciférase pour 8 h. Les cellules ont ensuite été infectées par RSV, comme décrit ci-dessous, pour 16 h puis l'activité des gènes rapporteurs a été mesurée à l'aide du Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) selon les indications du fabricant. Les activités sont exprimées comme des ratios par rapport à la condition NS après normalisation avec l'activité luciférase de la *Renilla*.

Infections virales

Des cellules A549 subconfluentes (~80%, 5×10^5 cellules/35 mm) ont été infectées avec le RSV type A2 (Advanced Biotechnologies) à un MOI (*Multiplicity Of Infection* : ratio de virus par cellule) de 3 dans du milieu F12 Ham contenant 2% de FBS et 1% de L-Glutamine pour le temps indiqué. Le même protocole a été utilisé pour les NHBE dans du milieu BEGM. Aux endroits indiqués, le U0126, le BI-D1870, IKK-2 inhibitor IV et le DMSO ont été ajoutés 1 h au préalable dans du milieu sans FBS. Au moment de l'infection, 2% de FBS ont été ajoutés.

Analyses de type western

Au moment de la récolte, le milieu de culture a été aspiré et remplacé par du PBS froid dans lequel les cellules ont été grattées, récoltées dans des eppendorfs et culottées par centrifugation. Elles ont ensuite été resuspendues dans un tampon de lyse NP-40 [50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycérol et 1% IGEPAL (Nonidet P-40)] contenant des inhibiteurs de protéases (1 μ g/ml leupeptine et 2 μ g/ml aprotine) et de phosphatases (30 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM PNPP et 25 mM β -Glycérophosphate) et incubées sur glace 20 minutes. Après 3 gels-dégels en azote liquide, les échantillons ont été centrifugés 20 minutes et le surnageant a été transféré dans un nouvel eppendorf. La concentration protéique dans les extraits cellulaires totaux (WCE) ainsi générés a été quantifiée par un essai Bradford (Biorad) en utilisant une gamme de BSA. 15 μ g a ensuite été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE puis transféré sur membrane de nitrocellulose (Biorad) et bloqué pour 1 h à température pièce avec une solution de blocage constituée de PBS (1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_4 , 18 mM KH_2PO_4) contenant 5% de lait écrémé et 0,05% Tween20. Après un lavage extensif avec une solution de PBS contenant 0,05% Tween20 (PBS-T), les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires indiqués et selon les conditions indiquées au Tableau II p.43. Après un lavage extensif au PBS-T, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire correspondant liés au HRP (*Horseradish peroxidase*) pour 1 h à température pièce

puis les bandes immunoréactives ont été visualisées par ECL à l'aide du *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* (PerkinElmer Life Sciences). Entre les anticorps phosphospécifiques et les anticorps totaux correspondants, les membranes ont été lavées dans une solution adéquate (0,2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH6.8, 0,1 mM β -mercaptoéthanol) pour 20 minutes à 50°C puis lavées extensivement dans du PBS et enfin bloquées à nouveau dans la solution de blocage.

En figure 3-8 A (p.63), les points RIPA ont été alternativement resuspendues dans un tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton, 0,5% DOC et 0,1% SDS) contenant des inhibiteurs de protéases (10 μ g/ml leupeptine, 20 μ g/ml aprotine et 1 μ M pepstatine) et incubés 20 minutes sur glace. Ils ont ensuite été soniqués 3 x 15 secondes puis leur concentration protéique a été quantifiée à l'aide d'un essai DC (Biorad). 15 μ g ont ensuite été analysés comme décrit ci-dessus.

Pour la détection de Nox2, les cellules ont été grattées directement dans un tampon de lyse (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycérol, 2% SDS et 0,1 M DTT) contenant les mêmes inhibiteurs de protéases que le tampon RIPA ci-dessus. Après avoir laissé incubé 15 minutes à température pièce, les échantillons ont été soniqués 3 x 15 secondes sur glace, puis chauffés 10 minutes à 70°C. Leur concentration protéique a été évaluée par un essai RC-DC (Biorad) puis 150 μ g ont été analysés comme précédemment.

Essai kinase IKK *in vitro*

30 μ l de protéine A-sépharose CL-4B (GE Healthcare) sèches par échantillon ont été lavées, 3 fois au PBS et 1 fois au TNET-BSA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% Triton et 1% BSA). Les billes ont ensuite été resuspendues dans le TNET-BSA et 2 μ g d'anticorps anti-IKK γ (Santa Cruz Biotechnology) par échantillon y ont été ajoutés pour être incubés durant 1 h à 4°C. Les billes ainsi couplées aux anticorps ont ensuite été réparties également dans des

tubes à vis où les complexes IKK de 200 µg de chaque WCE ont été immunoprécipités dans un tampon NP-40 complet (présenté précédemment) pour 3h à 4°C. Les billes ont ensuite été lavées 2 fois avec le tampon NP-40 et deux fois avec le tampon kinase (20 mM Hepes pH 7.4, 20 mM MgCl₂). Ensuite, l'essai kinase a été effectué sur ces billes pendant 30 minutes à 30°C dans le tampon kinase supplémenté avec 2 mM DTT et des inhibiteurs de phosphatases (1 mM Na₃VO₄, 10 mM PNPP et 25 mM β-Glycérophosphate) ainsi que 10 µCi d'ATP (γ-³²P), 20 µM d'ATP froid et 1 µg de IκBα-GST (acides aminés 1-55) recombinant par échantillon. Les échantillons ont ensuite été analysés par électrophorèse SDS-PAGE et le IκBα-GST a été détecté par coloration au bleue de coomassie du bas du gel, lequel a ensuite été séché et exposé environ 20 minutes à un écran phosphorImager (Amersham) puis l'incorporation de radioactivité (³²P) a été quantifiée à l'aide d'un appareil Typhoon Trio (Amersham Biosciences). Le haut du gel a été transféré sur membrane de nitrocellulose et IKKβ a été détecté tel que décrit précédemment. Les résultats sont présentés comme un pourcentage de l'activité mesurée dans les points contrôles stimulés.

Extraction d'ARN et PCR en temps réel

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit RNAqueous-96 Isolation (Ambion) en suivant les instructions du fabricant, mais en éliminant par contre l'étape de traitement à la DNaseI incluse dans ce kit. Après quantification de l'ARN total extrait par mesure de l'absorption à 260 nm et évaluation de sa qualité à l'aide du ratio d'absorption à 260 nm/280 nm, 1 µg de cette ARN total a été soumis à une transcription inverse avec le kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Une réaction sans transcriptase inverse a été effectuée pour servir de contrôle de contamination d'ADN génomique même si ce kit contient une étape d'élimination de l'ADN génomique. Les réactions de transcriptions inverses de 20 µl ont été diluées jusqu'à 100 µl avec de l'eau UltraPure (Gibco) et 1,5 µl de cette dilution a été utilisé par réaction de PCR en temps réel. Les réactions de PCR ont

toujours été effectuées en duplicata avec le FastStart SYBR Green Master (Roche) en présence de 0,4 μ M d'amorce sens et anti-sens de β -actine (S : gacttcgagcaagagatgg et AS : agcactgtgttgcgctacag) ou de Cardif (S : ggtgcatccaaagtgcctacta et AS : cagcagccaggcttactca). La détection a été effectuée avec un Rotor-Gene 3000 Real Time Thermal Cycler (Corbett Research). Les courbes standards produites afin de pouvoir déterminer le nombre de copie d'ARNm ont été réalisées par dilution en série des plasmides pCR2.1-TOPO- β -actine et myc-Cardif-pcDNA3.1. La valeur absolue du nombre de copie d'ARNm de Cardif ainsi obtenue est normalisée sur celle de la β -actine et le résultat de Cardif est présenté comme un pourcentage par rapport au point contrôle.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism et les tests spécifiques effectués sont indiqués aux endroits appropriés.

Tableau I : Liste des oligonucléotides ARNi utilisés dans cette étude

<u>Nom</u>		<u>Séquences</u>
siCtrl	séquence sens	cauagcguccuugaucacauu
	séquence anti-sens	ugugaucaaggacgcuauguu
siTBK-1	séquence sens	gcggcagaguaggugaaadTdT
	séquence anti-sens	uuucaccuaacucugccgedTdT
siIKK ϵ	séquence sens	gaagcauccagcagauucadTdT
	séquence anti-sens	ugaaucugcuggaugcuucdTdT
siIKK α	séquence sens	gcaggcucuucaggacauu
	séquence anti-sens	5'-Puguccugaaagagccugcuu
siIKK β	séquence sens	gguggaagagguggugagcuu
	séquence anti-sens	5'-Pgcucaccaccucuuccaccuu
siRIG-I	séquence sens	aacgauuccaucacuaucadTdT
	séquence anti-sens	5'-PauggauagugauggaauugcuudTdT
siMDA-5	séquence sens	ggugaaggagcagauucagdTdT
	séquence anti-sens	cugaaucugcuccuucaccdTdT
siCardif	séquence sens	cccacaggguccaguuugaudTdT
	séquence anti-sens	5'-PauacaacugaccuguggdTdT
siTRAF6	séquence sens	cugugcugcauaugccadTdT
	séquence anti-sens	5'-PugccauugaugcagcacagdTdT
siTRAF6(2)	séquence sens	guuauagauuucagaggauTdT
	séquence anti-sens	5'-PauccucugaaaucuuaacdTdT
siTRAF2	séquence sens	agggcuaataugaagaaggcadTdT
	séquence anti-sens	5'-PugccuucucuauauaugccudTdT
siTRAF3	séquence sens	agagucagguuccgaugaudTdT
	séquence anti-sens	5'-PauaucggaaccugacucudTdT
siNox2	séquence sens	gaagacaacuggacaggaauu
	séquence anti-sens	cauagucaggucuguucucuu

Tableau II : Liste des anticorps et de leurs conditions d'utilisation

<u>Anticorps</u>	<u>Dilution</u>	<u>Diluant</u>	<u>Provenance</u>
α -actine (C4)	1/10000	PBS-T-5% BSA	Millipore
α -Cardif	1/10000	PBS-T-5% lait	Alexis Biochemicals
α -ERK1/2	1/1000	PBS-T-5% lait	Cell Signaling
α -ERK1/2-P Thr 202/204 Thr185/187	1/1000	PBS-T-5% BSA	Cell Signaling
α -I κ B α	1/1000	PBS-T-5% BSA	Cell Signaling
α -I κ B α -P ser32 (14D4)	1/1000	PBS-T-5% BSA	Cell Signaling
α -IKK α	1/4000	PBS-T-5% BSA	Cell Signaling
α -IKK β (10AG2)	1/500	PBS-T-5% BSA	Imgenex
α -IKK ϵ	1 μ g/ml	PBS-T-5% lait	eBiosciences
α -MDA-5	1/3000	PBS-T-5% lait	Alexis Biochemicals
α -myc (9E10)	1/5000	PBS-T-5% lait	Sigma-Aldrich
α -Nox2	1/500	PBS-T-5% lait	Dr Dagher, CEA Grenoble
α -p65 (C-20)	1/10000	PBS-T-5% lait	Santa Cruz Biotechnology
α -p65-P ser536 (93H1)	1/4000	PBS-T-5% BSA	Cell Signaling
α -Parp	1/1000	PBS-T-5% lait	Cell Signaling
α -RIG-I	1/1500	PBS-T-5% lait	Alexis Biochemicals
α -RSV	1/4000	PBS-T-5% lait	Chemicon International
α -TBK-1 (72B587)	1/6000	PBS-T-5% lait	Imgenex
α -TRAF2 (C90-481)	1/4000	PBS-T-5% lait	BD Pharmingen TM
α -TRAF3 (H-122)	1/4000	PBS-T-5% lait	Santa Cruz Biotechnology
α -TRAF6 (H-274)	1/1000	PBS-T-5% lait	Santa Cruz Biotechnology
α -Tubuline (B7)	1/10000	PBS-T-5% lait	Santa Cruz Biotechnology
α -chèvre IgG (H+L)	variable	PBS-T-5% lait	Jackson ImmunoResearch Laboratories-inc
α -lapin IgG (H+L)	variable	PBS-T-5% lait	Jackson ImmunoResearch Laboratories-inc
α -lapin IgG (H+L)	variable	PBS-T-5% lait	KPL
α -souris IgG (H+L)	variable	PBS-T-5% lait	KPL
protéine-A	variable	PBS-T-5% BSA	Biorad

* Tous les anticorps primaires sont incubés sur la nuit à 4°C sauf l'actine et la tubuline (1h à température pièce).

Chapitre 3 Résultats

3.1 Les kinases RSK-1, TBK-1 et IKK ϵ ne sont pas impliquées dans la phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV

À ce jour, 5 kinases ont été identifiées pour phosphoryler p65 ser536 (p65-P ser536) en réponse à divers stimuli dans divers types cellulaires soit : RSK-1 [130, 165], TBK-1 et IKK ϵ [129, 166] ainsi que IKK α/β [167, 168]. Afin de déterminer la kinase responsable de cette phosphorylation critique pour l'activité de NF- κ B dans les cellules épithéliales des voies aériennes lors d'une infection par le RSV, nous avons ici vérifié la possible implication de l'une d'entre elles dans ce phénomène. Pour commencer, nous avons observé l'effet de l'inhibition spécifique de RSK-1, TBK-1 et IKK ϵ sur l'induction de p65-P ser536 en réponse à une infection par le RSV de cellules A549, une ligné cellulaire humaine utilisée classiquement comme modèle de AEC.

L'inhibition de RSK-1 a premièrement été effectuée à l'aide du U0126 qui est un inhibiteur spécifique de MEK1, une MAPK en amont de RSK-1. Le U0126 est l'inhibiteur normalement utilisé pour inhiber l'activité de RSK-1 [130, 165, 169]. L'analyse western blot présentée à la figure 3-1A (p.46) montre qu'un prétraitement au U0126 (20 μ M) de cellules A549 n'a aucun effet sur l'induction de p65-P ser536 en réponse au RSV. L'efficacité du traitement par l'inhibiteur a été vérifiée par l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 (kinases en amont de RSK-1 et en aval de MEK1). De plus, en figure 3-1B (p.46) l'utilisation du BI-D1870, un inhibiteur spécifique des RSKs [170], n'affecte toujours pas l'induction de p65-P ser536. Pour ce qui est de TBK-1 et IKK ϵ , leur implication potentielle a été testée en inhibant leur deux expressions par transfection d'ARNi spécifiques. La figure 3-1C (p.46) représente une cinétique d'infection de telles cellules où l'on voit une inhibition des dites kinases sans obtenir d'effet significatif sur l'induction de p65-P ser536 en réponse au RSV. Ces résultats excluent l'implication de ces 3 kinases dans l'induction de p65-P ser536 dans notre stimulation et modèle.

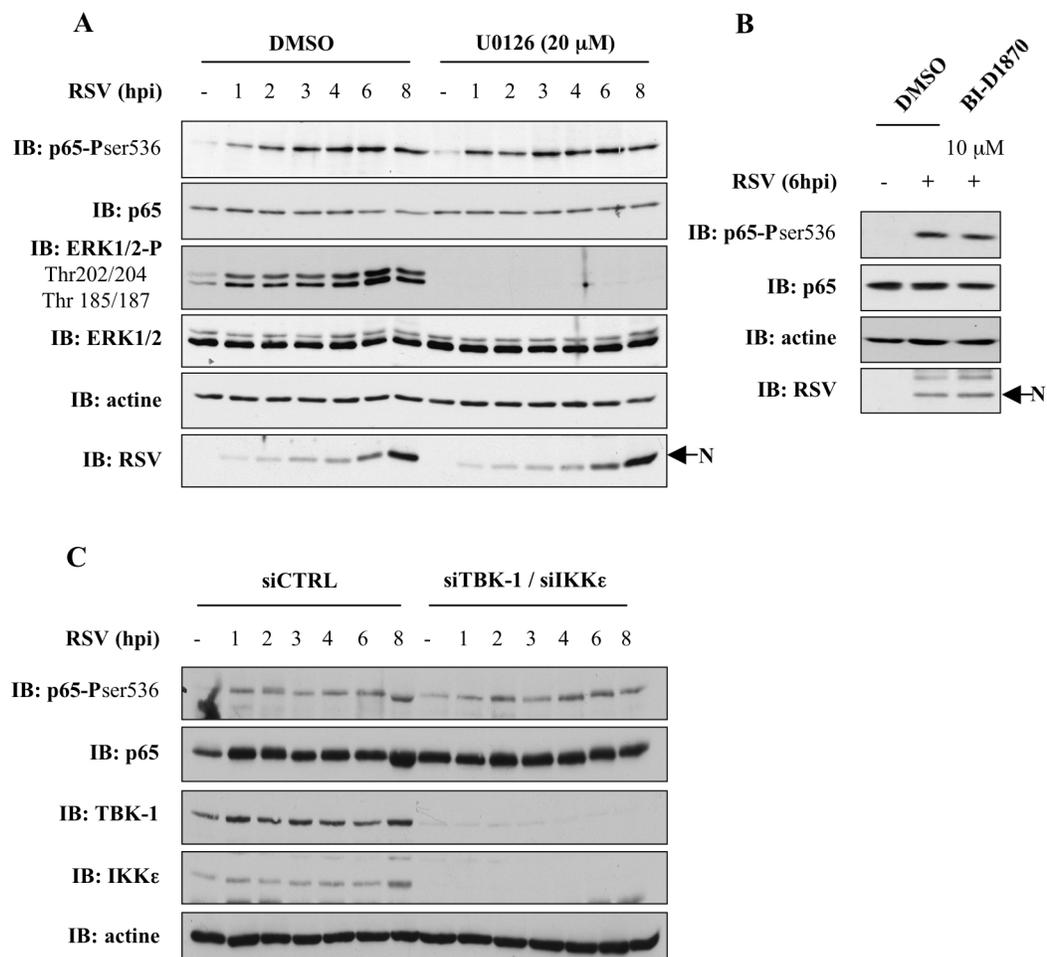


Figure 3-1 : Les kinases RSK-1, TBK-1 et IKK ϵ ne sont pas impliquées dans la phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV.

(A et B) Des cellules A549 ont été prétraitées pour 1 heure avec 20 μ M de U0126 (A), 10 μ M de BI-D1870 (B) ou du DMSO (véhicule) avant d'être infectées ou non avec RSV (3MOI) pour les temps indiqués (hpi). (C) Des cellules A549 ont été transfectées avec un oligonucléotide ARNi contrôle (siCtrl) ou des oligonucléotides ARNi spécifiques pour TBK-1 (siTBK-1) et des ARNi spécifiques pour IKK ϵ (siIKK ϵ) pour 63 h avant d'être infectées ou non par RSV (3MOI) pour les temps indiqués. (A-C) Les extraits cellulaires totaux (WCE) ont été résolus par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose suivit d'immunobuvardage (IB) à l'aide des anticorps indiqués. L'actine a servi de contrôle de chargement. Ces résultats sont représentatifs de 3 (A et C) et 2 (B) expériences différentes.

3.2 Les kinases IKK α / β sont responsables de la phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV

Nous avons ensuite étudié l'implication des kinases IKK α / β dans ce phénomène. L'inhibition de ce complexe a uniquement été effectuée dans un premier temps à l'aide d'un inhibiteur spécifique pour IKK β (IKK-2 inhibitor IV), puisqu'il n'en existe pas pour IKK α . En figure 3-2A (p. 48), l'analyse western blot montre une inhibition dose-dépendante de l'induction de p65-P ser536 en réponse au RSV en présence de l'inhibiteur spécifique. L'inhibition de la phosphorylation de I κ B α en sérine 32 (I κ B α -P ser32) nous indique l'efficacité de l'inhibiteur puisque ce site est le substrat classique de IKK β . De manière importante, la stabilité de la présence de la protéine N de RSV, détectée par immunoblot, entre toutes les conditions infectées nous indique que ces inhibitions de phosphorylation ne sont pas dues à un effet non-spécifique de l'inhibiteur sur l'entrer ou la réplication du virus, corrélant avec le fait que IKK β n'a jamais été démontrée pour avoir un rôle dans ces mécanismes. De plus, ces inhibitions sont stables dans le temps (à tout le moins de 4 h à 10 h) tel qu'exposé en figure 3-2B (p. 48), confirmant l'implication générale de IKK β . Enfin, en figure 3-2C (p. 48), l'inhibition combinée de IKK α et IKK β par ARNi réduit significativement l'induction des phosphorylations de p65 et I κ B α . Ces résultats suggèrent que le complexe kinase IKK α / β est responsable de la phosphorylation de p65 en sérine 536 lors d'une infection RSV de AEC.

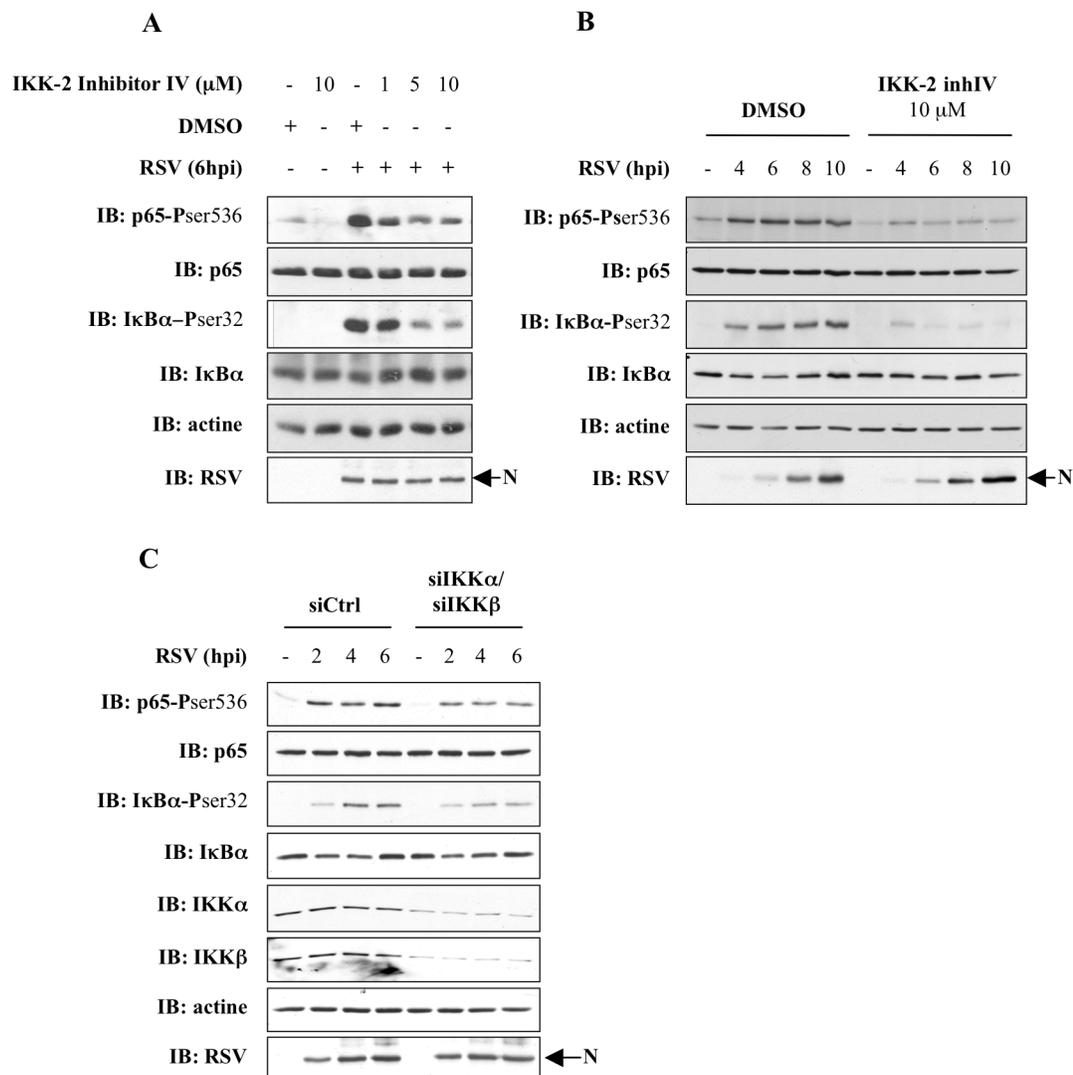


Figure 3-2 : Les kinases IKK α / β sont responsables de la phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV.

(A et B) Des cellules A549 ont été prétraitées pour 1 h avec 1-10 μM de IKK-2 Inhibitor IV pour 1 h avant d'être infectées ou non avec RSV (3MOI) pour les temps indiqués. (C) Des cellules A549 ont été transfectées avec un siCtrl ou un siIKK α et un siIKK β pour 63 h puis infectées ou non avec RSV pour les temps indiqués. (A-C) Les WCE résolus par SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose ont été analysés par IB avec les anticorps indiqués. Le chargement égal a été vérifié avec l'actine. Ces résultats sont représentatifs d'au moins 3 (A-B) et 1 (C) expériences différentes.

3.3 La phosphorylation de p65 en sérine 536 et de I κ B α en sérine 32 en réponse à RSV est dépendante de RIG-I et Cardif.

Lors d'une infection de cellules épithéliales par un virus à ARN, RIG-I, MDA-5 et TLR-3 sont les trois principaux senseurs précoces de l'infection [57, 171]. Leur reconnaissance de l'ARN viral engendre l'activation de voies de signalisation menant à l'activation, entre autre, de NF- κ B, permettant alors la production de cytokines et d'IFN de type 1. Par contre, lors d'une infection par le RSV, il a été démontré que TLR-3 n'était indispensable que de manière tardive à ce phénomène et que son induction était dépendante de l'activation RIG-I-dépendante de NF- κ B [88]. Ceci ne laisse que RIG-I et MDA-5 comme potentiels senseurs précoces d'infection responsables de l'induction de la phosphorylation de p65-P ser536. Ces deux RLRs, lorsqu'ils sont activés, interagissent avec Cardif, une protéine adaptatrice antivirale liée à la mitochondrie, permettant alors la signalisation en aval. Afin de déterminer quel RLR est impliqué et de confirmer le rôle de Cardif dans l'activation de NF- κ B par phosphorylation de p65 et I κ B α en réponse à RSV, nous avons inhibé, par une stratégie d'ARNi spécifiques, à tour de rôle chacune de ces protéines dans des cellules A549 que nous avons par la suite infectées par RSV.

L'analyse western blot présentée en figure 3-3A (p. 51) révèle que l'inhibition de RIG-I réduit fortement l'induction des phosphorylations de p65 en ser536 et I κ B α en ser32 alors que le même type d'inhibition sur MDA-5, en figure 3-3B (p. 51), n'a pour sa part aucun effet. On observe une induction de ces deux protéines dans les conditions contrôles infectées par RSV, mais l'inhibition de RIG-I par ARNi inhibe l'induction de MDA-5 alors que l'inverse n'est pas observé, semblant indiquer que l'expression de MDA-5 est dépendante de RIG-I dans cette stimulation. Ces résultats nous indiquent le rôle crucial de RIG-I par rapport à MDA-5 dans la détection et la réponse à ce virus en particulier. Pour ce qui est de la protéine adaptatrice Cardif, la figure 3-3C (p. 51) montre son importance cruciale dans l'induction de p65-P ser536 et I κ B α ser32 puisque son inhibition par ARNi bloque ces deux phosphorylations en

réponse à RSV. Aucuns de ces ARNi n'a eu d'effet sur le virus comme le montre la stabilité de détection de la protéine N. Ces résultats suggèrent donc que la reconnaissance du RSV et la signalisation subséquente permettant l'induction des phosphorylations de p65 et $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ est dépendante de RIG-I et Cardif.

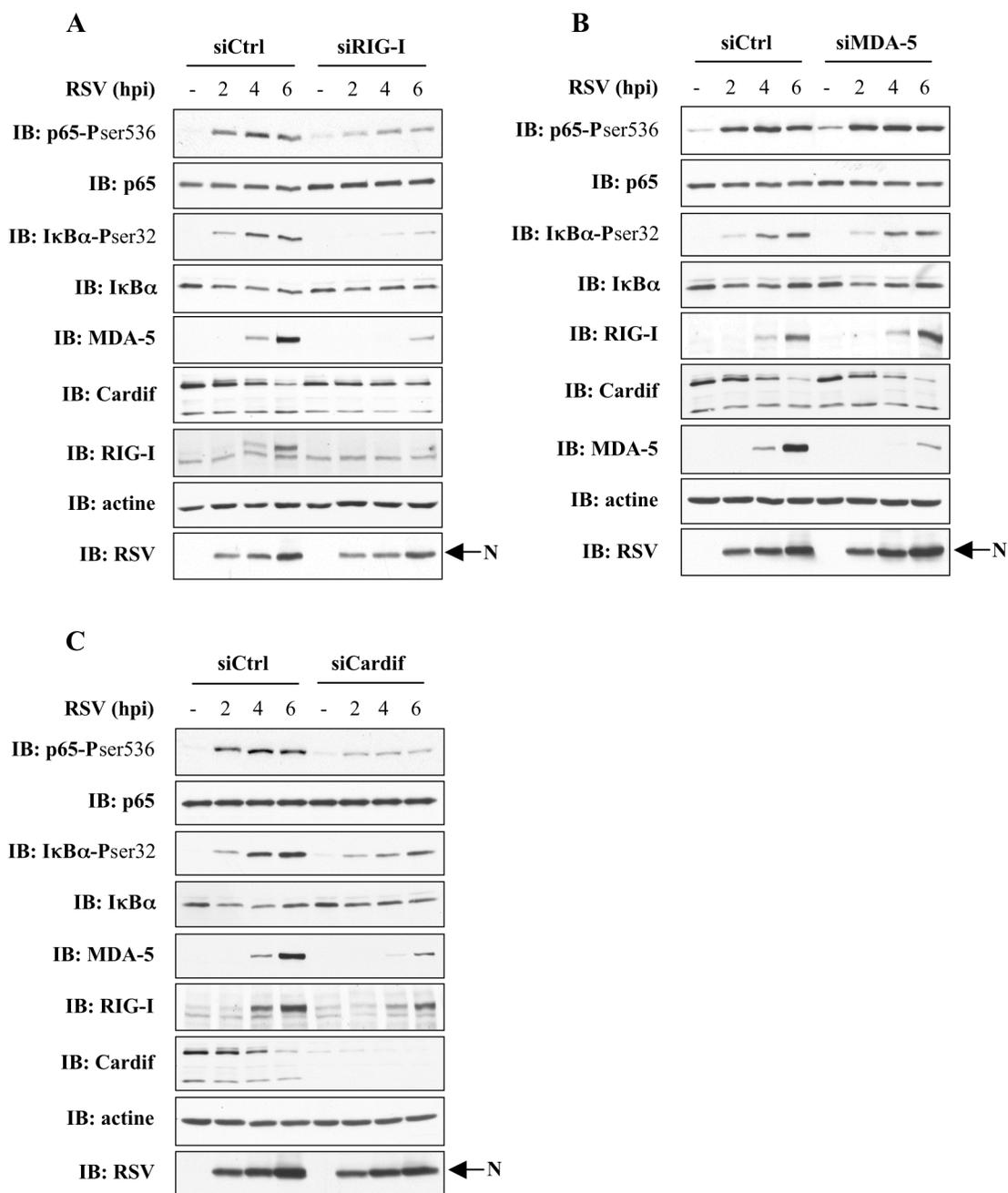


Figure 3-3 : La phosphorylation de p65 en sérine 536 et de IκBα en sérine 32 en réponse à RSV est dépendante de RIG-I et Cardif.

(A-C) Des cellules A549 ont été transfectées avec un siCtrl (A-C), un siRIG-I (A), un siMDA-5 (B) ou un siCardif (C) pour 63 h puis infectées ou non par RSV (3MOI) pour les temps indiqués. Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et analysés par IB à l'aide des anticorps indiqués. L'équivalence de chargement a été vérifiée par comparaison avec l'actine. Ces résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

3.4 La phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV est aussi dépendante de TRAF6.

Suite à l'activation et au recrutement de RIG-I à la protéine adaptatrice Cardif par un virus à ARN, 3 différents membres de la famille des TRAFs (TRAF2/3//6) ont été démontré capable d'interagir avec Cardif [70, 75, 77]. TRAF2, suite à l'activation des TNFRs, et TRAF6, en réponse à certain TLR ainsi qu'à l'IL-1R, sont bien caractérisés pour pouvoir activer le complexe IKK [78], que nous avons précédemment démontré être responsable de la phosphorylation de p65 en sérine 536. La capacité de TRAF3 de faire de même est controversée, son rôle classique étant plutôt au niveau de l'activation de IRF-3 via les homologues de IKK, TBK-1 et IKK ϵ [62, 172]. Afin de poursuivre la détermination en aval de Cardif de la voie de signalisation menant à la phosphorylation de p65 ser536 en réponse au RSV dans des AEC, nous avons inhibé spécifiquement chacun de ces trois TRAFs et analysé l'impact sur NF- κ B.

Afin de vérifier dans un premier temps le rôle de TRAF6, nous avons inhibé de manière spécifique l'expression de cette protéine dans des cellules A549 à l'aide d'ARNi puis les avons infectées par RSV. En figure 3-4A (p. 54), l'analyse western blot nous montre une diminution significative de l'induction de p65-P ser536 par inhibition de TRAF6. Par contre, aucun effet notable n'est observé sur l'induction de I κ B α -P ser32. La faible inhibition de TRAF6 par l'ARNi spécifique est à noter. Malheureusement, l'utilisation d'une deuxième séquence d'ARNi, en figure 3-4B (p. 54), n'a pu améliorer cette inhibition. En figure 3-4C (p. 54), l'analyse western blot de l'inhibition spécifique de TRAF2 et TRAF3 dans un contexte d'infection RSV ne montre aucun effet sur les inductions de p65-P ser536 et I κ B α -P ser32, malgré une excellente efficacité des séquences d'ARNi. De plus, en figure 3-4D (p. 54), l'inhibition de TRAF2 et TRAF3 dans une expérience de rapporteur luciférase sous contrôle d'un promoteur NF- κ B ne nous montre aucun impact sur l'activation du pouvoir transactivateur de NF- κ B en réponse au RSV. Par contre, dans cette même

expérience, l'inhibition de TRAF6 n'aboutit pas non plus à une diminution significative du pouvoir transactivateur de NF- κ B bien qu'une tendance en ce sens soit présente. Ces données n'étant représentatives que de 1 expérience, il serait important de la répéter pour voir si cette tendance peut s'avérer significative. En conclusion, ces résultats suggèrent que lors d'une infection par le RSV de cellules AEC, TRAF2 et TRAF3 ne sont pas impliqués dans l'activation de NF- κ B, alors que TRAF6 est essentiel à l'induction de p65-P ser536. Par contre, les protéines responsables de la signalisation en aval de Cardif et menant à I κ B α -P ser32 restent inconnues pour le moment, mais la voie de signalisation en aval de Cardif, TRADD/FADD, nouvellement mise à jour serait à envisager.

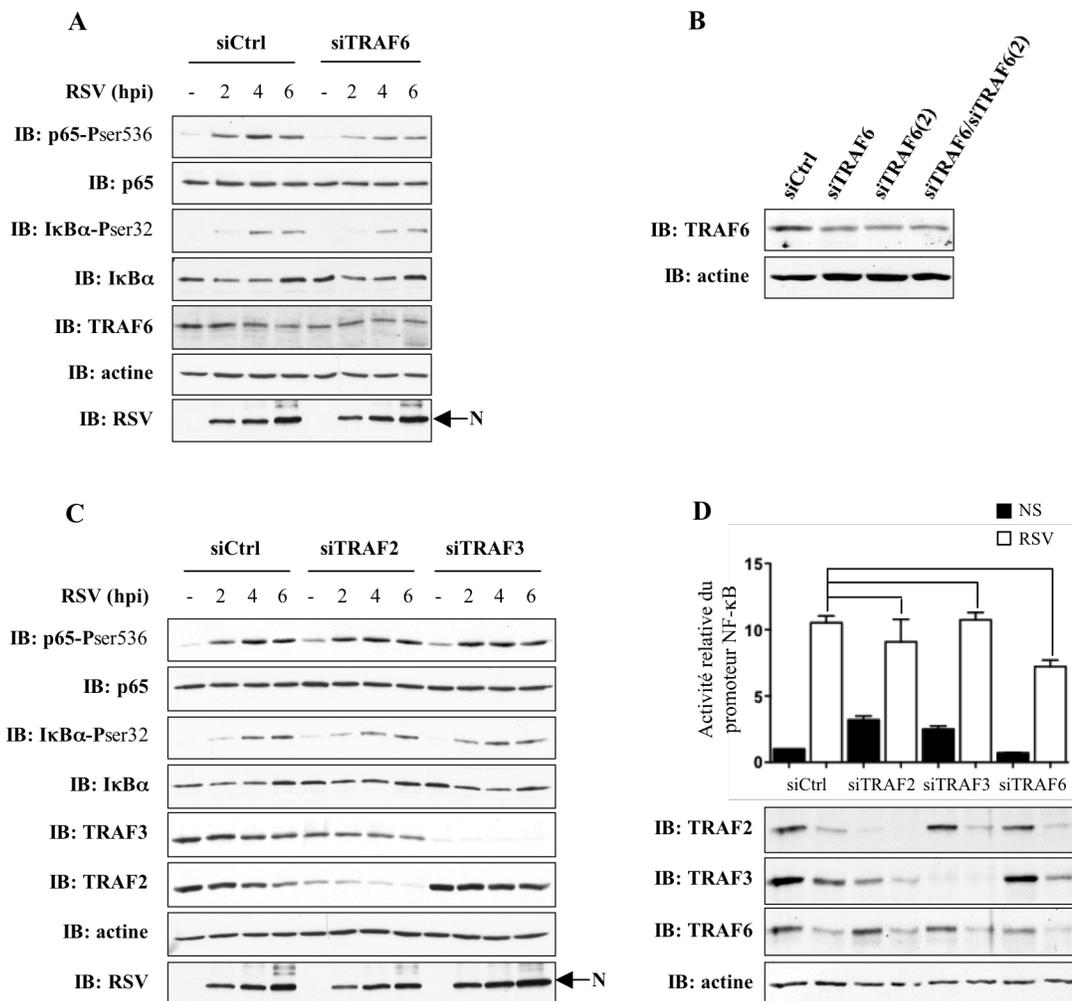


Figure 3-4 : La phosphorylation de p65 en sérine 536 en réponse à RSV est aussi dépendante de TRAF6.

(A-C) Des A549 ont été transfectées avec un siCtrl (A-C), un siTRAF6 (A et B), un siTRAF6(2) (B), un si TRAF2 (C) ou un siTRAF3 (C) pour 63 h puis infectées ou non avec RSV (3MOI) et analysées par IB avec les anticorps indiqués suite à la résolution par SDS-PAGE. (D) Des cellules transfectées avec un siCtrl, un siTRAF2, un siTRAF3 ou un siTRAF6 pour 48 h ont été transfectées avec le pRL-null *Renilla* luciférase (contrôle interne) et le P2(2X)TK-pGL3 NF-κB firefly luciférase pour 8 h avant d'être infectées (RSV) ou non (NS) avec RSV (3MOI) pour 16 h. Les activités luciférases ont été exprimées comme des ratios par rapport à la condition NS après normalisation avec l'activité luciférase de la *Renilla*. Ces résultats sont représentatifs de 3 (A-C) expériences différentes et de la moyenne ± écart type d'une expérience en triplicata (One-way ANOVA) (D).

3.5 L'enzyme Nox2 est essentielle à l'induction de la phosphorylation de p65 en sérine 536 et de IκBα en sérine 32 en réponse à RSV.

De précédents résultats de notre laboratoire ont démontré pour la première fois l'implication de l'isoforme de NADPH oxydase Nox2 dans la régulation de NF-κB [126]. En effet, alors que le diphénylèneiodonium (DPI), un inhibiteur des flavoprotéines, a réduit significativement l'expression du TNFα et de RANTES, l'inhibition de Nox2 par ARNi a inhibé l'activité transactivatrice de NF-κB en réponse à RSV de près de 60% lors d'essais luciférase. De plus, l'utilisation de ce même ARNi a bloqué l'induction des phosphorylations de p65 et IκBα en réponse à ce même virus. Nous voulions ici revérifier ces résultats sur p65 et IκBα ainsi que confirmer l'implication de cette molécule dans la régulation de NF-κB à l'aide d'une technique alternative.

L'analyse western blot présenté à la figure 3-5A (p. 56) confirme que l'inhibition de Nox2 par ARNi (figure 3-5B p. 56) réduit bien l'induction de p65-P ser536 et IκBα-P ser32 lors d'une cinétique d'infection avec RSV de cellules épithéliales A549. La petite GTPase Rac1 est essentielle à l'activation de Nox2 de par son rôle dans le recrutement de coactivateurs (p47 et p67phox) à la membrane [173]. L'utilisation d'une forme dominante négative de Rac1, Rac1N17, dans une expérience de rapporteur luciférase sous contrôle d'un promoteur NF-κB, en figure 3-5C (p. 56), nous montre une diminution de l'ordre de 50% de l'activité transactivatrice de NF-κB lors de l'inhibition de l'activité de Rac1, ce qui est comparable avec les résultats obtenue avec le siNox2. Ces résultats confirment les résultats précédemment obtenus dans le laboratoire et impliquant Nox2 dans la régulation de l'activation de NF-κB.

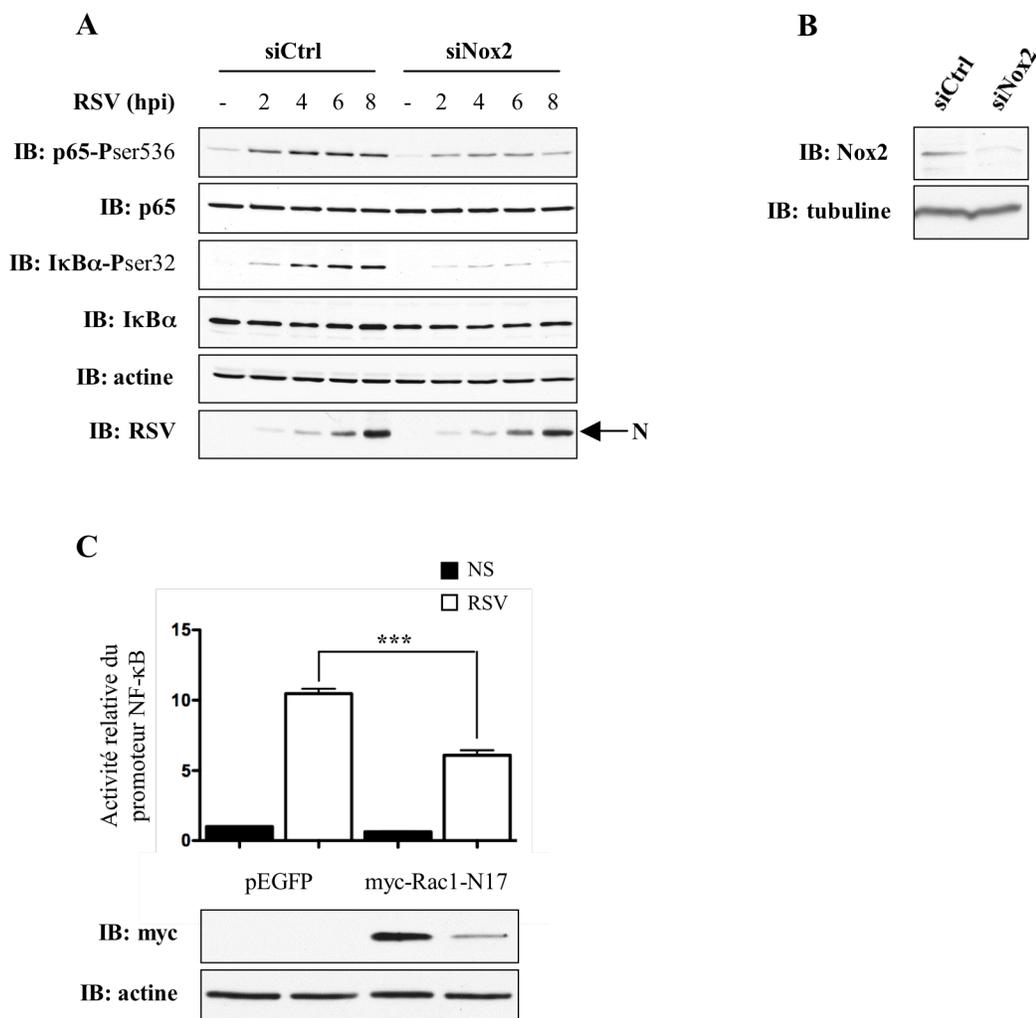


Figure 3-5 : L'enzyme Nox2 est essentielle à l'induction de la phosphorylation de p65 en sérine 536 et de IκBα en sérine 32 en réponse à RSV.

(A et B) Des cellules A549 ont été transfectées avec un siCtrl ou un siNox2 pour 63 h puis infectées ou non avec RSV (3MOI) et récoltées aux temps indiqués. Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE et analysés par IB avec les anticorps indiqués. Le chargement équitable a été contrôlé avec l'actine (A) ou la tubuline (B). (C) Des A549 ont été transfectées pour 16 h avec le plasmide pEGFP ou le myc-Rac1-N17-pRK5 puis transfectées avec le pRL-null *Renilla* luciférase (contrôle interne) et le P2(2X)TK-pGL3 NF-κB firefly luciférase pour 8h avant d'être infectées (RSV) ou non (NS) avec RSV (3MOI) pour 16 h. Les activités luciférase ont été exprimées comme des ratios par rapport à la condition NS après normalisation avec l'activité luciférase de la *Renilla*. Ces résultats sont représentatifs de 3 (A et B) et de 2 (C) expériences différentes (***, $p < 0,001$; moyenne \pm écart type d'un triplicata représentatif) (T-test indépendant).

3.6 Nox2 agit en amont du complexe IKK dans la voie de signalisation menant à l'induction de p65-P ser536 et I κ B α ser32 en réponse à RSV.

À ce point, nous avons établi la voie de signalisation menant à l'activation de NF- κ B par l'infection RSV comme étant RIG-I/Cardif/TRAF6/IKK et avons confirmé le rôle critique de Nox2 dans l'induction de cette activation. Il est actuellement crucial de positionner Nox2 dans cette voie de signalisation. Aucune phosphatase, qui pourrait alors être inhibée par Nox2 au cours de l'infection, n'a été décrite pour déphosphoryler directement p65 ou I κ B α . Pour sa part, l'oxydation de IKK β au niveau de la cystéine 179 a été montrée pour réguler négativement son activité [137], ce qui est contraire à l'action de Nox2 caractérisée ici. Par contre, deux phosphatases, PP2A et PP2C β , ont déjà été démontrées comme étant capable de déphosphoryler la boucle T des IKKs, les désactivant ainsi [118]. Donc, en inhibant l'activité de ces deux phosphatases par oxydation de leur cystéine catalytique, Nox2 pourrait réguler l'activité du complexe IKK. Nous avons donc vérifié si Nox2 agissait en amont du complexe IKK.

À la figure 3-6A (p. 58), on observe que l'inhibition de Nox2 par ARNi provoque une diminution de l'ordre de 50% de l'activité kinase du complexe IKK induite par une infection RSV dans des A549, telle que mesurée par une analyse de type essai kinase où l'activité kinase est mesurée par incorporation de phosphate marqué radioactivement sur le substrat classique du complexe IKK, I κ B α . Nous avons confirmé ces résultats, obtenus dans un modèle de cellule immortalisé, par l'utilisation de cellules humaines épithéliales bronchiques normales (NHBE) à la figure 3-6B (p. 58), des cellules primaires humaines. L'inhibition de l'activité kinase du complexe IKK obtenu par transfection de siNox2 dans ces cellules étant comparable avec celle obtenue précédemment dans les A549, Nox2 semble bien agir en amont du complexe IKK pour permettre l'induction de p65-P ser536 et I κ B α -P ser32.

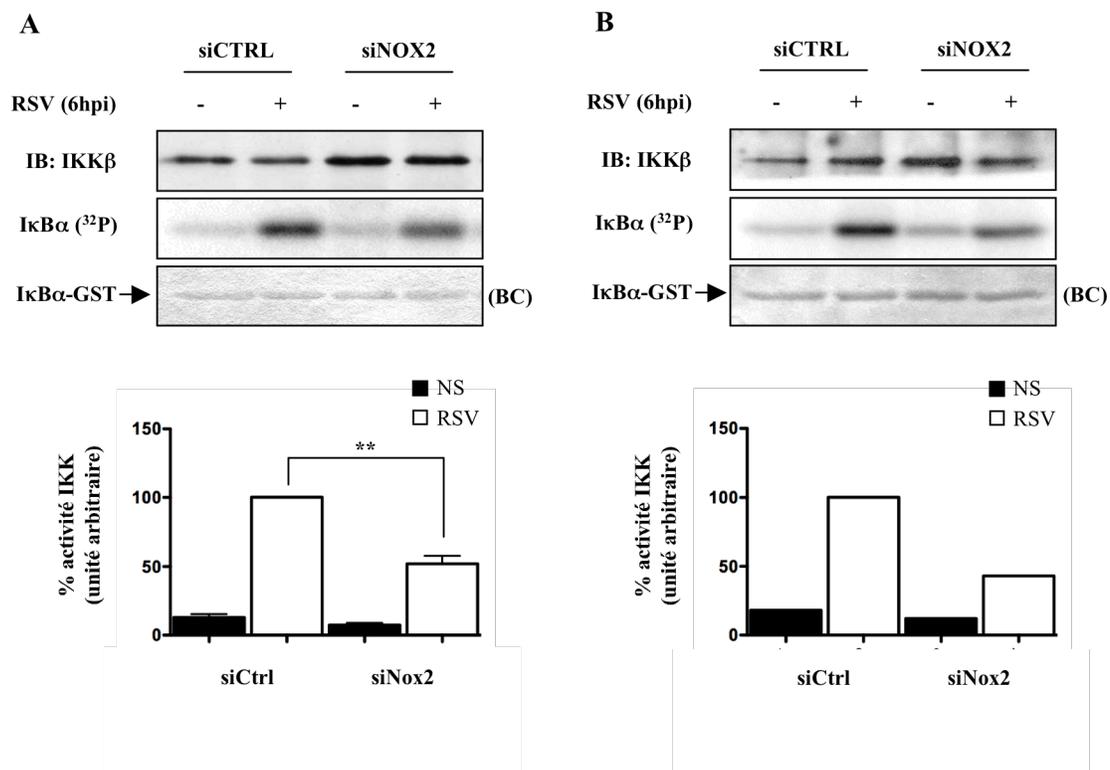


Figure 3-6 : Nox2 agit en amont du complexe IKK dans la voie de signalisation menant à l'induction de p65-P ser536 et I κ B α ser32 en réponse à RSV.

Des A549 (A) et des NHBE (B) ont été transfectées avec un siCtrl ou un siNox2 pour 63 h puis ont été infectées ou non pour 6 h avec RSV (3MOI). L'activité du complexe IKK, immunoprécipité avec un anticorps anti-IKK γ , a été analysée par un essai kinase *in vitro* avec le substrat I κ B α -GST (aa 1-55). Les réactions ont été résolues par SDS-PAGE et le substrat a été détecté par coloration au bleu de coomassie (BC). L'incorporation de radioactivité (32 P) a été quantifiée à l'aide d'un appareil Typhoon et l'activité du complexe IKK a été exprimée comme le ratio de l'incorporation de radioactivité sur la quantité de kinase immunoprécipitée (IB) telle que quantifiée par densitométrie avec le logiciel ImageJ. Les résultats sont présentés comme un pourcentage de l'activité mesurée dans les points siCtrl stimulés avec RSV. Ces résultats sont représentatifs de 1 (B) expériences (**, p < 0,01; moyenne \pm écart type de 4 expériences différentes) (T-test indépendant) (A).

3.7 L'absence de Nox2 réduit le niveau de détection de Cardif

Suite à l'observation que Nox2 agit en amont du complexe IKK, il nous fallait ensuite vérifier l'effet de l'absence de Nox2 sur chacun des autres membres de la voie, soit RIG-I, Cardif et TRAF6 afin de déterminer la cible de Nox2. Nous avons donc observé l'effet de cette absence sur la détection effectuée en western blot de ces protéines. Comme le présente la figure 3-7A (p. 60), l'inhibition de l'expression de Nox2 par ARNi dans des cellules A549 n'a aucun effet sur le niveau des protéines RIG-I et TRAF6 détectées. Par contre, cette même inhibition réduit considérablement le niveau de détection de la protéine Cardif. Il est important de noter que cet effet ne semble pas être un effet direct de la séquence d'ARNi utilisée puisque celle-ci ne s'aligne pas sur l'ARNm de Cardif. Bien entendu, l'utilisation d'une seconde séquence d'ARNi elle aussi spécifique pour Nox2 et ne s'alignant pas sur l'ARNm de Cardif permettra de confirmer ce résultat. Des résultats similaires ont été obtenus, en figure 3-7B (p. 60), dans des cellules NHBE, ce qui les confirme. Ces résultats démontrent donc que l'absence de Nox2 réduit le niveau de détection de la protéine Cardif dans les cellules épithéliales des voies aériennes.

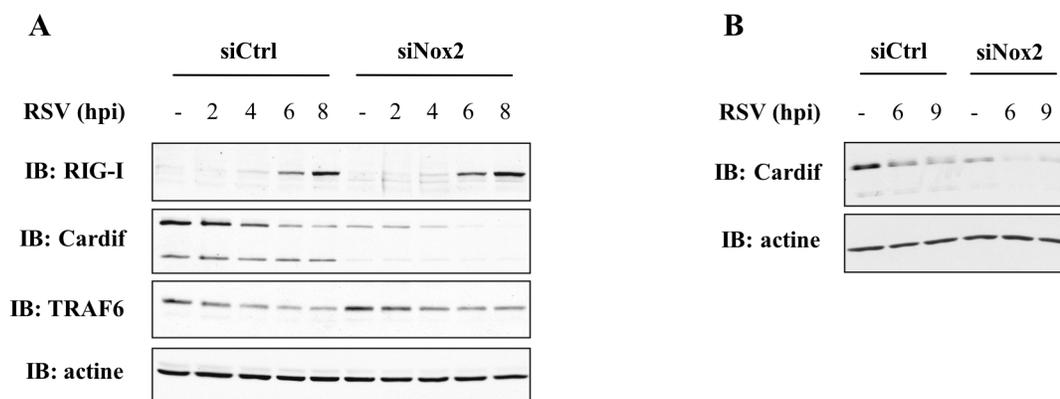


Figure 3-7 : L'absence de Nox2 réduit le niveau de détection de Cardif.

Des cellules A549 (A) et NHBE (B) ont été transfectées avec un siCtrl ou un siNox2 pour 63 h avant d'être stimulées par RSV (3MOI) pour les temps indiqués. Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE et analysés par IB avec les anticorps indiqués. L'actine a été utilisée pour vérifier l'égalité du chargement. Ces résultats sont représentatifs d'au moins 3 (A) et 1 (B) expériences indépendantes.

3-8 L'absence de Nox2 réduit la quantité d'ARNm de Cardif présent dans les AEC.

La réduction du niveau de détection d'une protéine en western blot peut être causée par plusieurs facteurs, tel que la relocalisation cellulaire, la dégradation de la protéine d'intérêt, la diminution de la traduction de son ARNm et la dégradation ou la baisse d'expression de son ARNm.

Lors de la découverte de Cardif, la diminution de sa détection protéique lors d'une infection par SeV a été observée [68]. Nous voyons aussi cette diminution de détection de la protéine Cardif en réponse au RSV (figure 3-3 p. 51 et figure 3-7 p. 60). Par l'utilisation d'une méthode d'extraction plus puissante, soit par l'utilisation d'un tampon de lyse contenant des détergents capables de solubiliser les membranes cellulaires, Seth et al. ont pu rétablir le niveau de détection de la protéine Cardif en présence de SeV, concluant ainsi que Cardif était relocalisé lors de l'infection par SeV. Bien que la réduction du niveau de détection de la protéine Cardif dans les points siNox2 semble être indépendante de cette relocalisation puisque cette dernière a toujours lieu dans les points siNox2 non-stimulés (figure 3-7 p. 60), nous avons vérifié s'il ne s'agissait pas d'un mécanisme semblable. L'utilisation d'une méthode d'extraction protéique plus puissante, à base de tampon RIPA plutôt que NP-40 et par l'utilisation de la sonication, n'a pas permis de réduire la diminution de détection de Cardif en absence de Nox2 (figure 3-8A p. 64). Malgré qu'il nous faudrait démontrer clairement l'efficacité de ce traitement, ce résultat semble écarter la relocalisation cellulaire comme explication à ce phénomène en réponse au siNox2.

Par la suite, nous nous sommes rapidement intéressés à deux groupes bien connus pour leurs rôles dans la stabilité protéique, soit le protéasome et les caspases. Le protéasome est un complexe protéique spécialisé dans la dégradation de protéines marquées pour être dégradées. Un des principaux marqueurs reconnus par la sous-unité 26S du protéasome est la poly-ubiquitination liée en lysine 48 [174]. Par contre, Cardif a uniquement été démontré jusqu'à maintenant comme pouvant subir une

poly-ubiquitination liée en lysine 63 sur sa lysine 500 [175]. Ainsi, en figure 3-8B (p. 64), l'utilisation de la lactacystine, un inhibiteur du protéasome, n'a pu inhiber la diminution de détection de la protéine Cardif dans les cellules transfectées avec le siNox2. Il s'agit par contre ici d'un résultat préliminaire nécessitant d'être revérifié en partie puisque nous n'avons pas de contrôle de l'efficacité du traitement lactacystine. Théoriquement, observer le niveau de I κ B α dans la cellule, qui devrait augmenter en présence de lactacystine puisque cette protéine est dégradée par le protéasome, devrait nous renseigner.

Cardif a récemment été montré pour être clivé par les caspases [176], ainsi que durant l'apoptose [177]. De plus, l'inhibition par ARNi de Nox2 a déjà été montré pour induire l'activité des caspases 3/7 [178]. En ce sens, en figure 3-8B (p. 64), l'inhibition de Nox2 par ARNi induit le clivage de Parp. Ainsi, l'effet du traitement lactacystine sur le Parp est de plus intéressant puisqu'il semble augmenter grandement l'effet du siNox2 sur le clivage du Parp, suggérant un effet protecteur du protéasome sur l'activation des caspases par le siNox2. Ce clivage de Parp est normalement caspase3-dépendant et est considéré comme un marqueur de l'apoptose [179]. L'utilisation du z-Vad-fmk, un inhibiteur général des caspases, n'a pas pu réduire la diminution de détection de la protéine Cardif en absence de Nox2. L'efficacité du traitement a été vérifiée au niveau de l'inhibition du clivage de Parp. Par contre, bien que le z-Vad-fmk soit un inhibiteur général des caspases, son action n'est pas aussi efficace sur toutes les enzymes et nous n'avons contrôlé ici que pour la caspase-3. L'implication d'une autre caspase plus résistante à cet inhibiteur ne peut donc pas être rejetée. Ces résultats en général tendent à exclure l'implication du protéasome et des caspases dans la diminution de détection de la protéine Cardif en absence de Nox2.

Après avoir observé la protéine Cardif, nous nous sommes tournés vers son ARNm. Une analyse de PCR en temps réel, en figure 3-8C (p. 64), montre une forte diminution de l'ARNm de Cardif dans des cellules A549 précédemment transfectées avec un ARNi spécifique à Nox2. Ce résultat suggère que Nox2 est essentiel à

l'induction des phosphorylations de p65 en sérine 536 et de I κ B α en sérine 32 de par son rôle sur le niveau d'ARNm de Cardif.

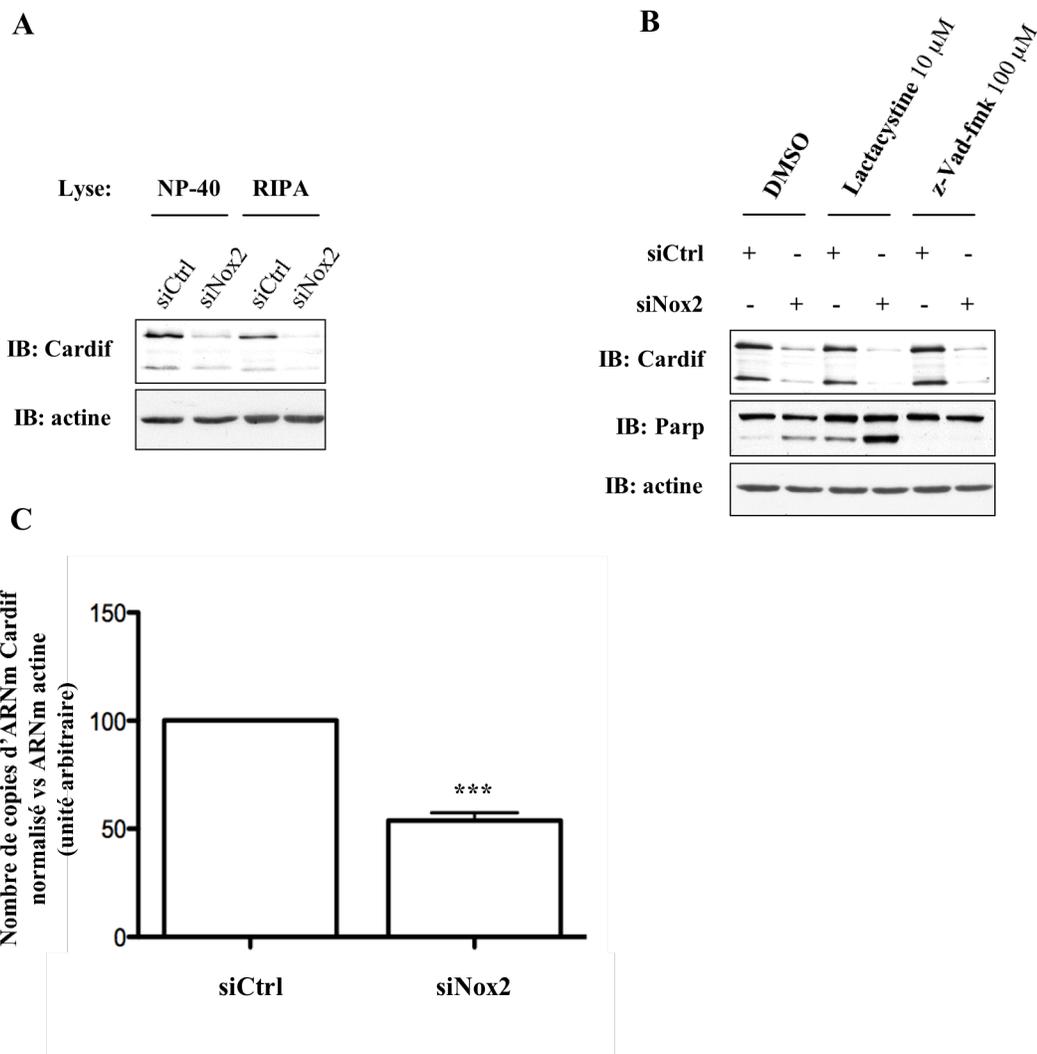


Figure 3-8 : L'absence de Nox2 réduit la quantité d'ARNm de Cardif présent dans les AEC.

Des A549 ont été transfectées avec un siCtrl ou un siNOX2. (A) Les cellules ont été récoltées après 63 h et les WCE ont été préparés avec le NP-40 ou le RIPA. (B) Après 56 h de transfection, les cellules ont été prétraitées avec le DMSO (véhicule), 10 μ M de lactacystine ou 100 μ M de z-Vad-fmk pour 16 h avant d'être récoltées. (A et B) Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE avant d'être analysés par IB avec les anticorps indiqués. L'actine a été utilisée pour vérifier le chargement. (C) L'ARN total a été extrait après 63 h de transfection. Cet ARN a été soumis à une transcription inverse et analysé par PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques pour l'actine ou Cardif. La valeur absolue de copie d'ARNm de Cardif a été quantifiée à l'aide d'une courbe standard produite par des dilutions en séries du plasmide myc-Cardif-pcDNA3.1 pour ensuite être normalisée par rapport à celle de l'actine. Le niveau d'ARNm est présenté comme un pourcentage de la quantité retrouvée dans les cellules siCtrl. Ces résultats sont représentatifs de 1 (A et B) expérience. (***, $p < 0,001$; moyenne \pm écart type de 5 expériences indépendantes) (T-test indépendant) (C).

Chapitre 4 Discussion

L'activation du facteur de transcription NF- κ B est un élément crucial de la réponse immédiate effectuée par la cellule et l'hôte en réponse à une infection virale. En effet, il possède un rôle prépondérant dans l'induction de l'expression de cytokines et de chimiokines proinflammatoires ainsi que des interférons de type 1 (IFN β) [180]. Dans l'infection RSV, la production par l'hôte d'une réponse inflammatoire excessive est fortement suggérée par les évidences expérimentales pour être responsable des symptômes de cette infection [181], rendant essentielle la bonne compréhension de l'activation de NF- κ B dans cette situation bien précise. L'activation classique de NF- κ B passe par la phosphorylation et la dégradation protéasome-dépendante des I κ Bs. Par contre, lors d'une infection RSV, bien que l'activité transactivatrice de NF- κ B soit observée après seulement 3 h, la dégradation de I κ B α n'est notée que tardivement [110, 126]. Bien que l'activation de la voie non-canonique de NF- κ B ait été montrée en réponse au RSV [123], le temps de réponse de cette voie, de par la nécessité de permettre la synthèse *de novo* de NIK, est trop lent pour être responsable de cette rapide activation. Dans certaines conditions, la phosphorylation directe des sous-unités de NF- κ B a été montrée pour permettre une activation I κ B-indépendante de NF- κ B [130, 131]. Bien que l'induction de la phosphorylation de p65 en sérine 536 ait déjà été montrée dans les AEC en réponse au RSV [88], son rôle crucial dans l'activation de NF- κ B, ainsi que son induction à aussi peu que 3 h après l'infection n'a été démontré que tout récemment [126]. Nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes menant et régulant cette phosphorylation.

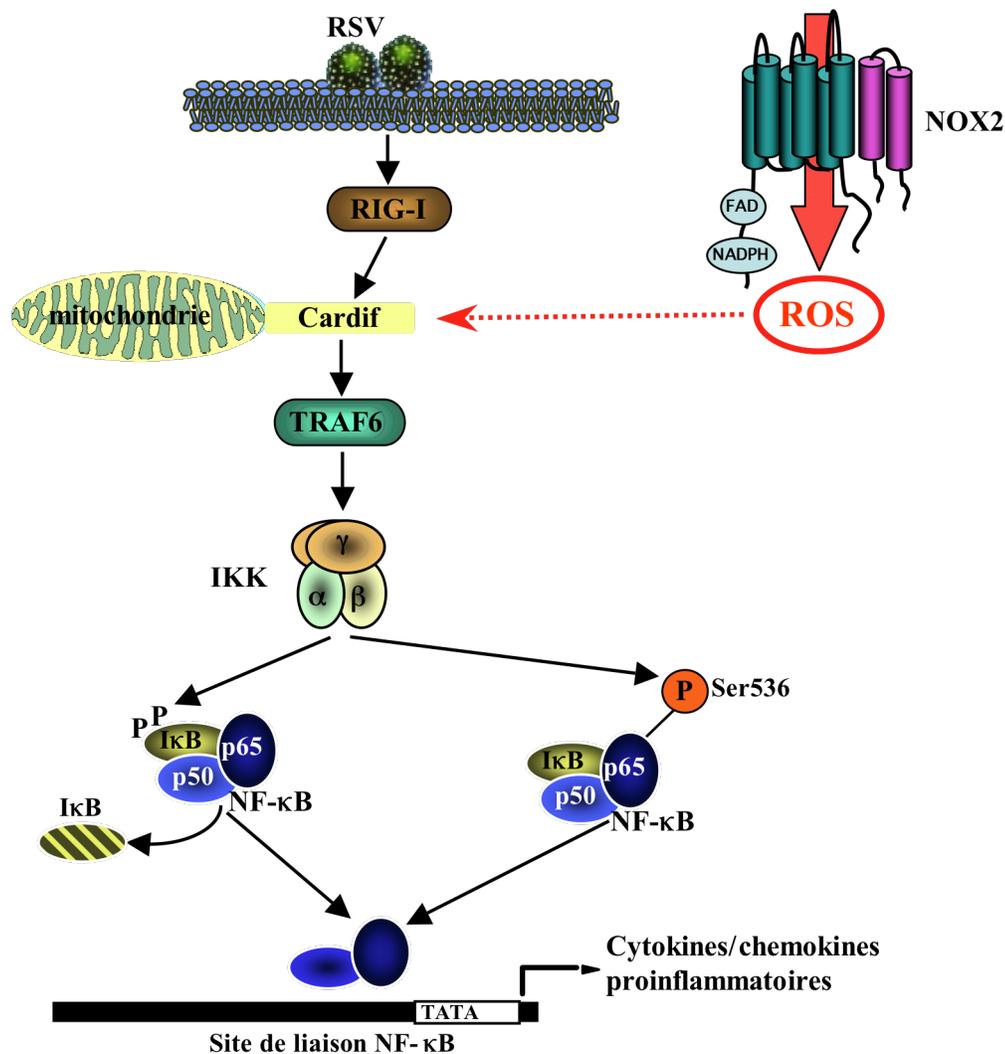


Figure 4-1 Résumé de l'étude.

Suite aux divers résultats obtenus au cours de cette étude, nous avançons que l'activation de NF- κ B, I κ B-dépendante et p65-P ser536-dépendante, en réponse au RSV est induite via l'activité kinase du complexe IKK. L'activation de ce complexe semble être quant à lui dépendant de l'action de TRAF6 suite à la reconnaissance de l'ARN viral par RIG-I. De plus, l'isoforme de NADPH oxydase Nox2 joue un rôle crucial en permettant la présence d'un niveau adéquat de Cardif dans la cellule pour la fonctionnalité de la voie. Le mécanisme de ce processus nécessitera par contre de plus amples investigations.

Cinq kinases ont été précédemment démontrées comme étant capables de phosphoryler p65 en sérine 536. RSK-1 phosphoryle p65 en réponse à l'angiotensine(Ang) II [165] ainsi qu'à p53 [130]. Les homologues des IKKs, dont il manque le domaine de liaison à IKK γ , TBK-1 et IKK ϵ , phosphorylent p65 en réponse au TNF α [166] et à l'IL-1 [129]. Enfin, les IKK α/β phosphorylent p65 en réponse au LPS [167], au TNF α [168], à l'Ang II [182] ainsi qu'en réponse à la signalisation par le récepteur de la lymphotoxine β [183]. D'après nos résultats, parmi ces dernières, les seules kinases agissant sur p65 en réponse au RSV sont IKK α/β , concordant avec une étude *in vivo* montrant le rôle crucial du complexe IKK dans la liaison de NF- κ B à l'ADN rapidement après l'infection [110]. Par contre, l'utilisation individuelle des ARNi, effectuée afin de tenter de déterminer spécifiquement laquelle de ces deux kinases était la responsable, ne nous ont pas éclairé. En effet, l'utilisation séparée des ARNi spécifiques n'a donné aucune inhibition de p65ser536 alors même que l'inhibiteur IV de IKK β a donné des résultats très concluants. En ce sens, une étude récente a montré dans un modèle de cellule β , les ABC-DLBCL (*activated β -cell-like diffuse large β -cell lymphoma*), un effet compensatoire de IKK α lors d'une inhibition à long terme de IKK β [184], ce qui est le cas avec les ARNi utilisés dans notre étude. Il peut par contre sembler étrange que deux des mécanismes d'activation principaux de NF- κ B soient gérés par le même complexe kinase dans une optique de «régulation fine» de ce facteur de transcription. En ce sens, il serait des plus intéressant de quantifier l'affinité du complexe IKK pour chacune de ces deux cibles, apportant ainsi potentiellement une réponse partielle au mécanisme.

Dans les cellules épithéliales, un nombre limité de senseurs ont été rapportés pour les virus à ARN, bien que ceux-ci représentent 80% de tous les virus connus chez l'homme, soit les RLRs et les TLR3 et 4. À cause de son rôle de reconnaissance des ARNd, TLR3 était pressenti pour être responsable de la reconnaissance immédiate du RSV par les cellules épithéliales. De plus, l'inhibition par ARNi de TLR3 avait montré une diminution de production de RANTES et de IP-10 dans des cellules épithéliales infectées par RSV [52]. Par contre, Liu et al. [88] ont démontré depuis que l'action de TLR-3 était dépendante d'une signalisation préalable au niveau

de NF- κ B et IRF-3 par RIG-I, qui permettait ensuite une induction IFN β -dépendante caractéristique de TLR-3 en réponse au RSV [50]. Cette implication initiale de RIG-I concorde parfaitement avec les résultats de notre étude montrant une inhibition de p65 ser536 à aussi peu que 2 h après l'infection. Les deux seuls membres activateurs des RLRs, RIG-I et MDA-5, ne reconnaissent normalement pas les mêmes virus, à l'exception des *Reovirus* et *Flavivirus* [59]. Dans le cadre du RSV, une augmentation du titre viral de RSV par rapport aux cellules contrôles a été obtenue dans des MEFs RIG-I^{-/-}, alors qu'aucun effet n'a été noté dans des MEFs MDA-5^{-/-} [59]. En ce sens, nous venons de démontrer que MDA-5 n'a aucun rôle à jouer dans l'induction de deux phosphorylations capitales pour l'activation de NF- κ B dans l'infection par ce virus. Depuis plusieurs années, TLR4 est connu pour reconnaître la protéine F du RSV [2]. De plus, lors de l'infection de souris TLR4 KO par RSV, ces dernières ont exhibées une déficience fonctionnelle de leur cellules NK et une production d'IL-12 ainsi qu'une clairance du virus plus faible que dans les souris sauvages [185], ce qui concorde avec le fait que des mutations du TLR4 chez les enfants corrèlent avec un plus haut taux de bronchiolites associées au RSV [186]. De plus, le TLR4 a été impliqué dans l'activation de NF- κ B [54]. Par contre, l'inhibition pratiquement totale de p65 ser536 que nous avons obtenu par inhibition de Cardif, un adaptateur n'ayant jamais été montré pour interagir dans la voie de signalisation de TLR4, semble exclure TLR4 de ce mécanisme. Son rôle pourrait être par ailleurs au niveau de I κ B α dont la phosphorylation n'a été que partiellement inhibée par le siCardif.

Quoique leur liaison à Cardif ait été clairement démontrée, l'implication des molécules TRAFs dans l'activation RIG-I-dépendante de NF- κ B a longtemps été controversée [64, 68, 70]. Par contre, deux études récentes semblent établir clairement le rôle de TRAF6 dans ce mécanisme. La translocation nucléaire et l'activation du pouvoir transactivateur de NF- κ B, mais pas de IRF-3, ont été inhibées dans des MEFs déficientes en TRAF6 en réponse à un virus à ARN, le VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) [80]. Ces résultats sont en accord avec l'idée récemment avancée que la régulation des voies anti-virales et proinflammatoires bifurque au niveau de Cardif [172]. De plus, l'induction d'IL-6 et d'IFN de type 1 ainsi que la

liaison de NF- κ B à l'ADN ont été réduites dans des MEFs TRAF6^{-/-} suite à des stimulations par des virus à ARN [187]. Ces découvertes appuient les résultats de notre étude au niveau de p65 ser536, surtout en sachant que TRAF6 a été démontré comme étant capable de permettre l'activation du complexe IKK dans la réponse à l'IL-1 [81]. Par contre, l'absence d'effet au niveau de I κ B α ser32 par l'inhibition de l'un ou l'autre des TRAFs pourrait être influencée par la faible efficacité de nos séquences d'ARNi spécifiques à TRAF6. Cette efficacité d'inhibition pourrait être suffisante pour affecter l'activation de IKK menant à la phosphorylation de p65, mais insuffisante pour inhiber celle menant à celle de I κ B α , via une différence dans l'affinité de IKK pour ses substrats. De plus, le haut niveau d'homologie entre les différents TRAFs pourrait engendrer un effet de compensation entre ces derniers, camouflant ainsi l'effet de l'inhibition d'un seul membre. D'un autre côté, certaines études ont montré qu'une voie TRADD/FADD/RIP1 pouvait activer NF- κ B de façon RLR-dépendante [79, 84]. Il est donc probable que l'activation de NF- κ B I κ B α -dépendante soit plutôt régulée par cette voie. Il est intéressant de noter que cette voie active aussi NF- κ B via le complexe IKK [188]. Ainsi, couplé à nos résultats, ceci suggère que le mode d'activation du complexe IKK pourrait influencer son affinité pour ses substrats.

La production de dérivés actifs de l'oxygène lors d'infections par le RSV a été à maintes fois identifiée pour être cruciale tant pour la réponse cellulaire et l'activation de l'immunité innée que dans l'induction des symptômes de cette infection. En effet, l'expression de cytokines proinflammatoires, la source des symptômes liés au RSV, comme l'IL-8 et RANTES, en réponse au RSV dans des AEC a été inhibée par l'utilisation de BHA et de NAC [145-147]. De plus, l'utilisation de BHA chez des souris infectées par le RSV a diminué leurs productions de cytokines et chimiokines, le recrutement de cellules inflammatoires ainsi que leurs symptômes [144]. En accord avec ceci, des souris KO pour Nrf2, un facteur de transcription responsable de la réponse cellulaire antioxydante, ont subi de plus graves conséquences inflammatoires liées à RSV que les souris sauvages [189]. Donc l'inhibition des ROS permet de diminuer les dommages liés à l'inflammation en

réduisant la production de molécules inflammatoires et ainsi le recrutement de cellules inflammatoires, permettant alors une meilleure résolution. Ainsi, l'étude de la source et de la cible de ces ROS activant NF- κ B est essentielle.

Snelgrove et al. [190], par l'étude de la réponse d'un modèle murin déficient en Nox2, ont découvert un bon candidat pour ce rôle en montrant que ces souris présentaient une diminution du titre viral ainsi qu'une meilleure résolution pulmonaire après une infection par le virus de l'influenza que les souris sauvages [190]. Depuis, des travaux de notre laboratoire ont confirmé ce rôle dans l'infection par RSV de cellules humaines [126]. En effet, l'inhibition de Nox2 par ARN interférence a diminué significativement l'activité de NF- κ B en plus d'inhiber l'induction de la phosphorylation de p65 en sérine 536 et de celle de I κ B α en sérine 32 en réponse à deux *Paramyxoviridae*, le RSV et SeV. De plus, cette implication identique de Nox2 en réponse à ces deux virus tend à écarter l'implication du TLR4 dans la régulation de ces deux phosphorylations, puisque ce TLR ne reconnaît pas SeV [191]. Dans notre étude, l'effet d'une forme dominante négative de Rac1 sur l'activité de NF- κ B a confirmé l'implication de Nox2 dans l'activation de NF- κ B. Il existe dans les cellules épithéliales une voie atypique d'activation de NF- κ B IKK-dépendante en réponse directe au H₂O₂, un ROS qui n'est pas produit directement par Nox2, mais en lequel le O₂⁻ est rapidement transformé dans la cellule [141, 142]. Nos résultats obtenus sur l'inhibition de l'activité du complexe IKK par le siNox2 concordaient avec l'implication de cette voie. Par contre, des résultats préliminaires obtenus par l'utilisation d'un ARNi spécifique contre PKC δ , un membre critique de la voie atypique, n'ont montré aucune modification du portrait de phosphorylation de p65. Nous avons plutôt montré, pour la première fois, un effet spécifique d'un Nox sur le niveau basal d'ARNm d'une protéine, Cardif, critique pour l'activation immédiate de NF- κ B en réponse au RSV dans des cellules épithéliales humaines, déterminant ainsi une cible des ROS produits par Nox2. Par contre, le mécanisme sous-jacent nécessite de plus amples recherches. En effet, l'impact des ROS produit par Nox2 pourrait s'appliquer soit au niveau de la transcription de l'ARNm de Cardif,

agissant donc au niveau de l'ADN, des facteurs et de la machinerie de transcription de manière spécifique, soit au niveau de la stabilité de cet ARNm.

En plus de ce rôle d'une production basale de ROS par Nox2, l'existence d'un rôle inductible de Nox2 en réponse au RSV, un virus bien connu pour induire la production de ROS, est très probable. En effet, divers rapports ont déjà montré un rôle inductible de Nox2, en réponse à divers stimulus, critique pour la signalisation. Lors d'une stimulation à l'IL-1, Myd88 a été démontré comme étant responsable de l'endocytose du récepteur de l'IL-1 alors qu'un complexe Rac1/Nox2 actif était essentiel au recrutement rédox-dépendant de TRAF6 au complexe Myd88/IL-1R1 [163]. De même, l'induction de l'activité de Nox2 est essentielle au recrutement de TRAF2 au complexe TNFR1/TRADD en réponse au TNF α [162]. Similairement, Nox2 pourrait permettre le recrutement de TRAF6 à l'adaptateur Cardif lors d'une stimulation par le RSV. Des résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent ce rôle inductible. L'activité kinase de IKK mesurée par essais kinase après 6 heures de stimulation de cellules A549 par le RSV est légèrement réduite par un prétraitement de 1h avec 20 μ M de DPI, un inhibiteur des flavoprotéines. De plus, ce traitement n'affecte pas le niveau protéique de Cardif, impliquant un mécanisme d'action supplémentaire des ROS.

Conclusion

En somme, ce travail a permis d'établir :

- 1) la voie de signalisation (RIG-I/Cardif/TRAF6/IKK β) menant à l'activation immédiate I κ B-indépendante de NF- κ B par phosphorylation directe au niveau de la sérine 536 de la sous-unité p65 en réponse au Virus Respiratoire Syncytial dans des cellules épithéliales des voies aériennes humaines.
- 2) il a de plus permis d'identifier le rôle essentiel que possède l'isoforme de NADPH oxydase Nox2 sur la régulation du niveau de Cardif, permettant ainsi que la voie précédemment décrite soit fonctionnelle.

Nous avons pu répondre ici à plusieurs questions importantes, mais en avons engendré par le fait même de nouvelles. Alors que Cardif semblait déjà être le point de bifurcation des voies antivirales et proinflammatoires, il pourrait être de plus le point de bifurcation de deux voies menant à deux modes d'activations différents du facteur NF- κ B, soit I κ B-dépendant et I κ B-indépendant. Par contre, la kinase permettant ces deux activations est la même dans les deux cas, ce qui mène à questionner de quelles façons ces deux voies activent différemment le complexe IKK pour moduler spécifiquement la réponse. De plus, la mise en évidence de l'impact d'une activité basale de Nox2 sur le niveau de Cardif bien que très intéressant ne nous indique actuellement pas le mécanisme sous-jacent. Il serait donc important d'établir si cet impact se produit au niveau transcriptionnel ou directement au niveau de l'ARN messenger.

Pour finir, ces nouvelles clarifications sur la régulation de NF- κ B lors d'une infection par RSV permettent de nous approcher encore un peu de l'élucidation du casse-tête inflammatoire que des milliers d'enfants à travers le monde ne trouvent que bien peu divertissant.

Bibliographie

1. Chidgey, S.M. and K.J. Broadley, *Respiratory syncytial virus infections: characteristics and treatment*. J Pharm Pharmacol, 2005. **57**(11): p. 1371-81.
2. 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.
3. Harris, J. and D. Werling, *Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response*. Cell Microbiol, 2003. **5**(10): p. 671-80.
4. Malhotra, R., et al., *Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells*. Microbes Infect, 2003. **5**(2): p. 123-33.
5. Feldman, S.A., R.M. Hendry, and J.A. Beeler, *Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6610-7.
6. Domachowske, J.B. and H.F. Rosenberg, *Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(2): p. 298-309.
7. Pastey, M.K., J.E. Crowe, Jr., and B.S. Graham, *RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7262-70.
8. Pastey, M.K., et al., *A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3*. Nat Med, 2000. **6**(1): p. 35-40.
9. Jin, H., et al., *Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo*. Virology, 2000. **273**(1): p. 210-8.
10. Spann, K.M., et al., *Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]*. J Virol, 2004. **78**(8): p. 4363-9.
11. Bitko, V., et al., *Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth*. J Virol, 2007. **81**(4): p. 1786-95.
12. Glezen, P. and F.W. Denny, *Epidemiology of acute lower respiratory disease in children*. N Engl J Med, 1973. **288**(10): p. 498-505.
13. Holberg, C.J., et al., *Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life*. Am J Epidemiol, 1991. **133**(11): p. 1135-51.
14. Ogra, P.L., *Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response*. Paediatr Respir Rev, 2004. **5 Suppl A**: p. S119-26.
15. Stang, P., N. Brandenburg, and B. Carter, *The economic burden of respiratory syncytial virus-associated bronchiolitis hospitalizations*. Arch Pediatr Adolesc Med, 2001. **155**(1): p. 95-6.

16. Maggon, K. and S. Barik, *New drugs and treatment for respiratory syncytial virus*. Rev Med Virol, 2004. **14**(3): p. 149-68.
17. Kapikian, A.Z., et al., *An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine*. Am J Epidemiol, 1969. **89**(4): p. 405-21.
18. Cusi, M.G., et al., *Influenza virosomes are an efficient delivery system for respiratory syncytial virus-F antigen inducing humoral and cell-mediated immunity*. Vaccine, 2002. **20**(29-30): p. 3436-42.
19. Nallet, S., et al., *Respiratory syncytial virus subunit vaccine based on a recombinant fusion protein expressed transiently in mammalian cells*. Vaccine, 2009.
20. Georgescu, G. and R.F. Chemaly, *Palivizumab: where to from here?* Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(1): p. 139-47.
21. van Schaik, S.M., R.C. Welliver, and J.L. Kimpen, *Novel pathways in the pathogenesis of respiratory syncytial virus disease*. Pediatr Pulmonol, 2000. **30**(2): p. 131-8.
22. Yoon, J.S., et al., *Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells*. Pediatr Pulmonol, 2007. **42**(3): p. 277-82.
23. Haeberle, H.A., et al., *Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice: role of MIP-1alpha in lung pathology*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 878-90.
24. Culley, F.J., et al., *Role of CCL5 (RANTES) in viral lung disease*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 8151-7.
25. Tekkanat, K.K., et al., *RANTES (CCL5) production during primary respiratory syncytial virus infection exacerbates airway disease*. Eur J Immunol, 2002. **32**(11): p. 3276-84.
26. Christensen, J.E. and A.R. Thomsen, *Co-ordinating innate and adaptive immunity to viral infection: mobility is the key*. Apmis, 2009. **117**(5-6): p. 338-55.
27. Chaplin, D.D., *I. Overview of the human immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S430-5.
28. Kim, T.K. and T. Maniatis, *The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome*. Mol Cell, 1997. **1**(1): p. 119-29.
29. Wathelet, M.G., et al., *Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 507-18.
30. Grandvaux, N., et al., *The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion*. Curr Opin Infect Dis, 2002. **15**(3): p. 259-67.
31. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809.
32. Oritani, K., et al., *Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(4): p. 337-48.

33. Tulic, M.K., et al., *TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 132-40.
34. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1033-6.
35. Thomsen, A.R., et al., *Regulation of T cell migration during viral infection: role of adhesion molecules and chemokines*. Immunol Lett, 2003. **85**(2): p. 119-27.
36. Jafri, H.S., et al., *Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice*. J Infect Dis, 2004. **189**(10): p. 1856-65.
37. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 173-83.
38. Cella, M., et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med, 1999. **5**(8): p. 919-23.
39. Bitko, V. and S. Barik, *Persistent activation of RelA by respiratory syncytial virus involves protein kinase C, underphosphorylated I κ B β , and sequestration of protein phosphatase 2A by the viral phosphoprotein*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 5610-8.
40. Janeway, C.A., Jr., *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. Immunol Today, 1992. **13**(1): p. 11-6.
41. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
42. Chang, J. and T.J. Braciale, *Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8⁺ T-cell effector activity and peripheral CD8⁺ T-cell memory in the respiratory tract*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 54-60.
43. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
44. Ishii, K.J., et al., *Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 352-63.
45. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 353-64.
46. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 1-20.
47. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
48. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
49. Sato, S., et al., *Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1087-95.
50. Groskreutz, D.J., et al., *Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1733-40.

51. Huang, S., W. Wei, and Y. Yun, *Upregulation of TLR7 and TLR3 gene expression in the lung of respiratory syncytial virus infected mice*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2009. **49**(2): p. 239-45.
52. Rudd, B.D., et al., *Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression*. *J Virol*, 2005. **79**(6): p. 3350-7.
53. Rudd, B.D., et al., *Deletion of TLR3 alters the pulmonary immune environment and mucus production during respiratory syncytial virus infection*. *J Immunol*, 2006. **176**(3): p. 1937-42.
54. Haeberle, H.A., et al., *Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways*. *J Infect Dis*, 2002. **186**(9): p. 1199-206.
55. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 730-7.
56. Mogensen, T.H. and S.R. Paludan, *Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors*. *J Mol Med*, 2005. **83**(3): p. 180-92.
57. Yoneyama, M. and T. Fujita, *RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007. **18**(5-6): p. 545-51.
58. 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.
59. 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.
60. Kato, H., et al., *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5*. *J Exp Med*, 2008. **205**(7): p. 1601-10.
61. Takahashi, K., et al., *Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses*. *Mol Cell*, 2008. **29**(4): p. 428-40.
62. Yoneyama, M. and T. Fujita, *RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors*. *Immunol Rev*, 2009. **227**(1): p. 54-65.
63. Cui, S., et al., *The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I*. *Mol Cell*, 2008. **29**(2): p. 169-79.
64. Rothenfusser, S., et al., *The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I*. *J Immunol*, 2005. **175**(8): p. 5260-8.
65. Venkataraman, T., et al., *Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses*. *J Immunol*, 2007. **178**(10): p. 6444-55.
66. Komuro, A. and C.M. Horvath, *RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2*. *J Virol*, 2006. **80**(24): p. 12332-42.
67. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. *Nature*, 2005. **437**(7062): p. 1167-72.
68. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. *Cell*, 2005. **122**(5): p. 669-82.
69. 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.

70. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*. Mol Cell, 2005. **19**(6): p. 727-40.
71. Gack, M.U., et al., *TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 916-920.
72. Li, X.D., et al., *Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(49): p. 17717-22.
73. Baril, M., et al., *MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease*. J Virol, 2009. **83**(3): p. 1299-311.
74. Lad, S.P., et al., *Identification of MAVS splicing variants that interfere with RIGI/MAVS pathway signaling*. Mol Immunol, 2008. **45**(8): p. 2277-87.
75. Saha, S.K., et al., *Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif*. EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3257-63.
76. Bishop, G.A., *The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 775-86.
77. Oganessian, G., et al., *Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 208-11.
78. Chen, Z.J., *Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 758-65.
79. Balachandran, S., et al., *Fas-associated death domain-containing protein-mediated antiviral innate immune signaling involves the regulation of Irf7*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2429-39.
80. 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.
81. Lamothe, B., et al., *Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation*. J Biol Chem, 2007. **282**(6): p. 4102-12.
82. Wang, C., et al., *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
83. Kanayama, A., et al., *TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 535-48.
84. Michallet, M.C., et al., *TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 651-61.
85. Balachandran, S., E. Thomas, and G.N. Barber, *A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 401-5.
86. Takahashi, K., et al., *Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4520-4.
87. Scagnolari, C., et al., *Gene expression of nucleic acid-sensing pattern recognition receptors in children hospitalized for respiratory syncytial virus-associated acute bronchiolitis*. Clin Vaccine Immunol, 2009. **16**(6): p. 816-23.
88. 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, 2007. **81**(3): p. 1401-11.

89. Bhoj, V.G., et al., *MAVS and MyD88 are essential for innate immunity but not cytotoxic T lymphocyte response against respiratory syncytial virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 14046-51.
90. Andrejeva, J., et al., *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17264-9.
91. Childs, K.S., et al., *Mechanism of mda-5 Inhibition by paramyxovirus V proteins*. J Virol, 2009. **83**(3): p. 1465-73.
92. Lo, M.S., R.M. Brazas, and M.J. Holtzman, *Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 9315-9.
93. Elliott, J., et al., *Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3428-36.
94. Ling, Z., K.C. Tran, and M.N. Teng, *Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3734-42.
95. Swedan, S., A. Musiyenko, and S. Barik, *Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins Decrease Multiple Members of the Cellular Interferon Pathways*. J Virol, 2009.
96. Hendricks, D.A., et al., *Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells*. J Gen Virol, 1987. **68 (Pt 6)**: p. 1705-14.
97. Shingai, M., et al., *Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction*. Int Immunol, 2008. **20**(9): p. 1169-80.
98. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
99. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 49-62.
100. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S81-96.
101. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007. **13**(11): p. 460-9.
102. Carrasco, D., F. Weih, and R. Bravo, *Developmental expression of the mouse c-rel proto-oncogene in hematopoietic organs*. Development, 1994. **120**(10): p. 2991-3004.
103. Gerondakis, S., et al., *Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6888-95.
104. Jamaluddin, M., et al., *The major component of IkappaBalpha proteolysis occurs independently of the proteasome pathway in respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 4849-57.
105. Perkins, N.D., *Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6717-30.
106. Han, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-inducible IkappaBalpha proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the*

- ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappaB activation.* J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 787-94.
107. Liu, Z.Q., et al., *Proteolytic processing of nuclear factor kappa B by calpain in vitro.* FEBS Lett, 1996. **385**(1-2): p. 109-13.
 108. Quirling, M., et al., *Detection of IKKbeta-IKKgamma subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling.* J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37452-60.
 109. Kwak, Y.T., et al., *Analysis of domains in the IKKalpha and IKKbeta proteins that regulate their kinase activity.* J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14752-9.
 110. Haeberle, H.A., et al., *IkappaB kinase is a critical regulator of chemokine expression and lung inflammation in respiratory syncytial virus infection.* J Virol, 2004. **78**(5): p. 2232-41.
 111. Fiedler, M.A. and K. Wernke-Dollries, *Incomplete regulation of NF-kappaB by IkappaBalpha during respiratory syncytial virus infection in A549 cells.* J Virol, 1999. **73**(5): p. 4502-7.
 112. Inohara, N., et al., *An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways.* J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27823-31.
 113. Poyet, J.L., et al., *Activation of the Ikappa B Kinases by RIP via IKKgamma/NEMO-mediated Oligomerization.* J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37966-37977.
 114. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling.* Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
 115. Palkowitsch, L., et al., *Phosphorylation of serine 68 in the IkappaB kinase (IKK)-binding domain of NEMO interferes with the structure of the IKK complex and tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappaB activity.* J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 76-86.
 116. Hinz, M., et al., *Signal responsiveness of IkappaB kinases is determined by Cdc37-assisted transient interaction with Hsp90.* J Biol Chem, 2007. **282**(44): p. 32311-9.
 117. Kray, A.E., et al., *Positive regulation of IkappaB kinase signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A.* J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 35974-82.
 118. DiDonato, J.A., et al., *A cytokine-responsive Ikb kinase that activates the transcription factor NF-kB.* Nature, 1997. **388**: p. 548-554.
 119. Lin, L., G.N. DeMartino, and W.C. Greene, *Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome.* Cell, 1998. **92**(6): p. 819-28.
 120. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway.* Science, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
 121. Liao, G., et al., *Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation.* J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26243-50.
 122. Varfolomeev, E., et al., *IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis.* Cell, 2007. **131**(4): p. 669-81.
 123. Choudhary, S., et al., *Respiratory syncytial virus influences NF-kappaB-dependent gene expression through a novel pathway involving MAP3K14/NIK*

- expression and nuclear complex formation with NF-kappaB2*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 8948-59.
124. Liu, P., et al., *Respiratory syncytial virus induces RelA release from cytoplasmic 100-kDa NF-kappa B2 complexes via a novel retinoic acid-inducible gene-1{middle dot}NF-kappa B-inducing kinase signaling pathway*. J Biol Chem, 2008. **283**(34): p. 23169-78.
 125. Neumann, M. and M. Naumann, *Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity*. Faseb J, 2007. **21**(11): p. 2642-54.
 126. Fink, K., et al., *Dual role of NOX2 in respiratory syncytial virus- and sendai virus-induced activation of NF-kappaB in airway epithelial cells*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6911-22.
 127. Zhong, H., et al., *The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 625-36.
 128. Gapuzan, M.E., G.A. Pitoc, and T.D. Gilmore, *Mutations within a conserved protein kinase A recognition sequence confer temperature-sensitive and partially defective activities onto mouse c-Rel*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(1): p. 92-9.
 129. Buss, H., et al., *Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF-{kappa}B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I{kappa}B kinase (IKK)-{alpha}, IKK{beta}, IKK{epsilon}, TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55633-43.
 130. Bohuslav, J., et al., *p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26115-25.
 131. Sasaki, C.Y., et al., *Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I{kappa}B{alpha}-independent NF-{kappa}B pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34538-47.
 132. Chen, L.F., et al., *NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 7966-75.
 133. Adler, V., et al., *Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling*. Oncogene, 1999. **18**(45): p. 6104-11.
 134. Engelhardt, J.F., *Redox-mediated gene therapies for environmental injury: approaches and concepts*. Antioxid Redox Signal, 1999. **1**(1): p. 5-27.
 135. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
 136. Rhee, S.G., et al., *Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation*. Sci STKE, 2000. **2000**(53): p. PE1.
 137. Pandey, M.K., et al., *Butein, a tetrahydroxychalcone, inhibits nuclear factor (NF)-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression through direct inhibition of IkappaBalpha kinase beta on cysteine 179 residue*. J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17340-50.

138. Schreck, R., P. Rieber, and P.A. Baeuerle, *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1*. EMBO Journal, 1991. **10**: p. 2247-2258.
139. Li, N. and M. Karin, *Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?* FASEB J, 1999. **13**(10): p. 1137-43.
140. Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette, *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1493-505.
141. Storz, P. and A. Toker, *Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway*. EMBO J, 2003. **22**(1): p. 109-20.
142. Storz, P., H. Doppler, and A. Toker, *Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2614-26.
143. Casola, A., et al., *Oxidant tone regulates rantes gene expression in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. role in viral-induced interferon regulatory factor activation*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 19715-22.
144. Castro, S.M., et al., *Antioxidant treatment ameliorates respiratory syncytial virus-induced disease and lung inflammation*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(12): p. 1361-9.
145. Carpenter, L.R., J.N. Moy, and K.A. Roebuck, *Respiratory syncytial virus and TNF alpha induction of chemokine gene expression involves differential activation of Rel A and NF-kappa B1*. BMC Infect Dis, 2002. **2**(1): p. 5.
146. Mastronarde, J.G., M.M. Monick, and G.W. Hunninghake, *Oxidant tone regulates IL-8 production in epithelium infected with respiratory syncytial virus*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **13**(2): p. 237-44.
147. Roebuck, K.A., et al., *Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(3): p. 291-8.
148. Mochizuki, H., M. Todokoro, and H. Arakawa, *RS virus-induced inflammation and the intracellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells*. Inflammation, 2009. **32**(4): p. 252-64.
149. Sumimoto, H., K. Miyano, and R. Takeya, *Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 677-86.
150. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.
151. Bokoch, G.M. and U.G. Knaus, *NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(9): p. 502-8.
152. Geiszt, M., K. Lekstrom, and T.L. Leto, *Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51661-8.
153. Grandvaux, N., A. Soucy-Faulkner, and K. Fink, *Innate host defense: Nox and Duox on phox's tail*. Biochimie, 2007. **89**(9): p. 1113-22.
154. Vignais, P.V., *The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(9): p. 1428-59.

155. Stasia, M.J., et al., [*Chronic-granulomatous disease*]. *Rev Med Interne*, 2009. **30**(3): p. 221-32.
156. Kawahara, T., et al., *Type I Helicobacter pylori lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells*. *Infect Immun*, 2001. **69**(7): p. 4382-9.
157. Chiang, E., et al., *Cutting edge: apoptosis-regulating signal kinase 1 is required for reactive oxygen species-mediated activation of IFN regulatory factor 3 by lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 2006. **176**(10): p. 5720-4.
158. Patel, D.N., et al., *TLR4-NOX4-AP-1 signaling mediates lipopolysaccharide-induced CXCR6 expression in human aortic smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **347**(4): p. 1113-20.
159. Park, H.S., et al., *Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B*. *J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 3589-93.
160. Park, H.S., et al., *Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells*. *Cardiovasc Res*, 2006. **72**(3): p. 447-55.
161. Amara, N., et al., *Diesel exhaust particles induce matrix metalloprotease-1 in human lung epithelial cells via a NAD(P)H oxidase/NOX4 redox-dependent mechanism*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **293**(1): p. L170-81.
162. Li, Q., et al., *Endosomal Nox2 Facilitates Redox-Dependent Induction of NF- κ B by TNF α* . *Antioxid Redox Signal*, 2008.
163. Li, Q., et al., *Nox2 and Rac1 regulate H₂O₂-dependent recruitment of TRAF6 to endosomal interleukin-1 receptor complexes*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(1): p. 140-54.
164. Indukuri, H., et al., *Ikkepsilon regulates viral-induced interferon regulatory factor-3 activation via a redox-sensitive pathway*. *Virology*, 2006. **353**(1): p. 155-65.
165. Zhang, L., et al., *A new cellular signaling mechanism for angiotensin II activation of NF-kappaB: An IkappaB-independent, RSK-mediated phosphorylation of p65*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1148-53.
166. Fujita, F., et al., *Identification of NAPI, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(21): p. 7780-93.
167. Sakurai, H., et al., *IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(43): p. 30353-6.
168. Sakurai, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(38): p. 36916-23.
169. Nam, H.J., et al., *The ERK-RSK1 activation by growth factors at G2 phase delays cell cycle progression and reduces mitotic aberrations*. *Cell Signal*, 2008. **20**(7): p. 1349-58.

170. Sapkota, G.P., et al., *BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo*. *Biochem J*, 2007. **401**(1): p. 29-38.
171. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. *Science*, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
172. Bowie, A.G. and L. Unterholzner, *Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 911-22.
173. Miyano, K. and H. Sumimoto, *Role of the small GTPase Rac in p22phox-dependent NADPH oxidases*. *Biochimie*, 2007. **89**(9): p. 1133-44.
174. Pickart, C.M., *Targeting of substrates to the 26S proteasome*. *FASEB J*, 1997. **11**(13): p. 1055-66.
175. Paz, S., et al., *Ubiquitin-regulated recruitment of IkappaB kinase epsilon to the MAVS interferon signaling adapter*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(12): p. 3401-12.
176. Rebsamen, M., et al., *The antiviral adaptor proteins Cardif and Trif are processed and inactivated by caspases*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(11): p. 1804-11.
177. Scott, I. and K.L. Norris, *The mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS, is cleaved during apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **375**(1): p. 101-6.
178. Peshavariya, H., et al., *NADPH oxidase isoform selective regulation of endothelial cell proliferation and survival*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009. **380**(2): p. 193-204.
179. Boulares, A.H., et al., *Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(33): p. 22932-40.
180. Yamamoto, M. and K. Takeda, *Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses*. *J Infect Chemother*, 2008. **14**(4): p. 265-9.
181. Garofalo, R.P. and H. Haerberle, *Epithelial regulation of innate immunity to respiratory syncytial virus*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000. **23**(5): p. 581-5.
182. Douillette, A., et al., *The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkappaB kinase complex*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13275-84.
183. Jiang, X., et al., *The NF-kappa B activation in lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(2): p. 919-26.
184. Lam, L.T., et al., *Compensatory IKKalpha activation of classical NF-kappaB signaling during IKKbeta inhibition identified by an RNA interference sensitization screen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(52): p. 20798-803.
185. Haynes, L.M., et al., *Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus*. *J Virol*, 2001. **75**(22): p. 10730-7.
186. Tal, G., et al., *Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease*. *J Infect Dis*, 2004. **189**(11): p. 2057-63.

187. Konno, H., et al., *TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5674.
188. Jackson-Bernitsas, D.G., et al., *Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma*. Oncogene, 2007. **26**(10): p. 1385-97.
189. Cho, H.Y., et al., *Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(2): p. 138-50.
190. Snelgrove, R.J., et al., *An absence of reactive oxygen species improves the resolution of lung influenza infection*. Eur J Immunol, 2006. **36**(6): p. 1364-73.
191. van der Sluijs, K.F., et al., *Toll-like receptor 4 is not involved in host defense against respiratory tract infection with Sendai virus*. Immunol Lett, 2003. **89**(2-3): p. 201-6.